



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca



Università degli Studi
di Palermo

EFFETTI DI MUTAZIONI DIVERSE DI RAS IN CELLULE DI CARCINOMA COLORETTALE (HT29)

TUTOR: Prof.ssa I. Albanese

DOTTORANDO: Dott. Fabrizio Miranda

COORDINATORE: Prof.ssa G. Sconzo

S.S.D.: BIO11

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO – VIALE DELLE
SCIENZE, ED. 16 - PALERMO

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA CELLULARE
(Biologia Cellulare e dello Sviluppo) XXII° CICLO 2008-2010

1. INTRODUZIONE

1.1 IL TUMORE

Un organismo animale può essere visto come una società o un ecosistema in cui gli individui sono le cellule, che si riproduce in seguito alla divisione cellulare e che è organizzato in strutture collaborative dette tessuti. Il tumore è una classe di malattie caratterizzate da un'incontrollata riproduzione di alcune cellule dell'organismo che invadono e colonizzano territori a loro non riservati. Le cellule normali si dividono soltanto quando il rapporto tra i segnali stimolatori della crescita e quelli inibitori, prodotti da altre cellule poste nelle vicinanze, è a favore dei primi. Le cellule cancerose, invece, smettono di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo della proliferazione a seguito di danni al loro patrimonio genetico formando una massa di tessuto che costituisce appunto il tumore. In realtà, è possibile classificare i tumori come “benigni” quando sono costituiti da cellule che mantengono in parte le loro caratteristiche morfologiche e funzionali, pur esibendo autonomia moltiplicativa. Essi sono spesso avviluppati da una capsula di tessuto connettivo fibroso che li delimita nettamente dai tessuti confinanti, con i quali assumono un rapporto di contiguità. Un tumore viene invece definito “maligno” o cancro quando è costituito da cellule che appaiono morfologicamente e funzionalmente diverse dalle corrispondenti normali. I tessuti vicini al tumore maligno vengono infiltrati e distrutti dalle cellule tumorali che si sostituiscono a quelle normali, fenomeno questo caratteristico della malignità e noto con il termine di "invasività". Quest'ultimo evento comporta anche l'abilità da parte delle cellule maligne di invadere la parete dei vasi linfatici, dei capillari, delle venule, di entrare, quindi, nel circolo sanguigno o nei vasi linfatici e formare tumori secondari o “metastasi” a distanza in tessuti o organi diversi da quello di origine. Indubbiamente, la perdita della capacità di rispondere ai fattori di crescita o al fenomeno noto come inibizione da contatto e la conseguente proliferazione incontrollata è uno dei principali fattori che determinano la formazione di un tumore, tuttavia la sopravvivenza di questa massa tumorale dipende anche dalla capacità delle cellule che la compongono di bloccare i pathways che normalmente porterebbero al processo noto come apoptosi attraverso la produzione di proteine inibitrici dell'apoptosi (es: IAP's, bcl-2). Ancora, deve poter eludere il sistema immunitario mediante la produzione di citochine immunosoppressive (es: IL-10) o la mancata esposizione di molecole di superficie

necessarie per l'attivazione dei linfociti (es: HLA; B7), e indurre la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi), necessari per garantire l'apporto di ossigeno e fattori nutritivi, tramite, ad esempio, il rilascio dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF's) o del fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF).

Alterazioni a livello del DNA, dette mutazioni, determinano il processo di trasformazione che porta una cellula a diventare tumorale. Dal punto di vista chimico queste alterazioni possono essere di vario tipo: mutazioni puntiformi, delezioni, amplificazioni e traslocazioni cromosomiche.

Esse possono essere ereditate (cancro familiare o ereditario) o causate da fattori ambientali (cancro sporadico). Va ricordato a questo punto che vi è una mutabilità di base del DNA dovuta al processo di replicazione; la sua frequenza, che è di circa 1×10^6 non è comunque sufficiente di per se a rendere una cellula cancerosa. Questo valore aumenta notevolmente mediante esposizione a specifici fattori detti, appunto, cancerogeni o a radiazioni o all'azione di particolari virus.

Da che cosa dipendano l'origine e l'evoluzione di un cancro è comunque, fino ad oggi, oggetto di dibattito.

Per quanto riguarda l'origine, nonostante sia universalmente accettato che la trasformazione maligna di una cellula sia dovuta ad una alterazione del codice genetico, esistono teorie contrastanti circa il tipo di alterazione: quella "mutazionale" prevede che un tumore origini da una mutazione puntiforme a livello della sequenza del DNA; quella "aneuploide" prevede che, invece, origini da uno squilibrio nel numero di cromosomi (Li R. et al. 1999).

Si è, comunque, abbastanza d'accordo nel ritenere che l'instaurarsi della trasformazione maligna coincida con la mutazione con effetto attivante dei cosiddetti proto-oncogeni (che regolano positivamente la proliferazione cellulare, quali ad esempio Ras, c-myc o BCR-ABL), e/o mutazioni inattivanti o delezioni dei geni detti oncosoppressori (che in condizioni normali inibiscono la divisione delle cellule, quali ad esempio p53 o APC). In particolare, la teoria dell'origine monoclonale dei tumori maligni (o ipotesi multi step) suggerita da Vogelstein (1993) propone che i tumori si originano a partire da una singola cellula progenitrice mutante che genera una popolazione di cellule leggermente anomale dalle quali, attraverso successivi cicli di

mutazioni e selezione naturale, discende una massa di cellule pienamente trasformate definita “tumore primario”. Da quest’ultimo, alcune cellule possono, in seguito a nuovi eventi mutazionali, differenziarsi ulteriormente acquisendo la capacità di invadere altri organi o tessuti, cioè di dare origine alle metastasi. (Vogelstein et al. 1993).

Per quanto riguarda questa tappa e cioè la formazione delle metastasi, essa risulta ancora poco chiara. Mentre inizialmente si era pensato che essa implicasse necessariamente la presenza di tutte le mutazioni acquisite dal tumore primario fino ai suoi stadi più avanzati, alcuni studi hanno indicato che questa tappa avviene per buona parte in parallelo rispetto alla crescita del tumore primario e in dipendenza dalla mutazione di una serie di geni che non coincidono con quelli che causano l’avanzamento del tumore primario. Ad esempio il 7% di un gruppo di pazienti per tumori al seno presentava metastasi senza che fino a quel momento si fosse evidenziato un tumore primario (CUP, cancer of unknown primary, Ramaswamy et al., 2003). Tecniche quali l’ibridazione comparativa del genoma (CGH) e i microarrays si sono rivelate utili nel mostrare che in qualche cellula potrebbero avvenire una serie di mutazioni geniche distinte rispetto a quelle che si verificano nella massa della popolazione cellulare del tumore primario (Schmidt-Kittler et al., 2003). Esperimenti condotti su una linea cellulare (MDA-MB-231) di tumore mammario umano mediante selezione *in vivo* e successiva analisi del trascrittoma, hanno evidenziato la presenza di un sottopopolazione di cellule che presentava alterazioni geniche differenti rispetto a quelle presenti nella popolazione originale, e che tali alterazioni conferivano a queste cellule un maggiore potenziale metastatico (Kang et al. 2003). Infine, recenti osservazioni hanno portato alla formulazione dell’ipotesi che molti, se non tutti, tumori contengono una piccola popolazione di cellule staminali, le cellule staminali cancerose (CSCs), che sono responsabili dell’origine e del mantenimento del tumore (Burkert et al. 2006). Esse non solo conservano la capacità di auto rigenerarsi ma danno anche origine a una progenie in grado di differenziarsi progressivamente generando quell’eterogeneità cellulare che spesso si riscontra nelle masse tumorali. Inoltre tali cellule duplicano molto più lentamente rispetto alle altre cellule maligne e pertanto i farmaci e le terapie efficaci contro i tessuti tumorali potrebbero non avere effetto contro di loro (Papailiou et al. 2010). Non è ancora chiaro se queste CSCs derivano da cellule staminali che hanno subito mutazioni o, piuttosto, da cellule già differenziate che hanno

nuovamente acquisito proprietà staminali durante la progressione tumorale. Quindi, l'identificazione di queste cellule staminali cancerose e dei fattori che regolano il loro comportamento potrebbe avere in futuro un enorme impatto sul metodo utilizzato per il trattamento e la ricerca eseguita sulle trasformazioni neoplastiche.

1.2 IL CARCINOMA COLORETTALE

Il carcinoma coloretale (CRC) è un tipo di tumore che risulta dall'accumularsi di numerose alterazioni associate ai suoi specifici stadi differenziativi. Esso costituisce un ottimo modello di studio dell'evoluzione somatica dei tumori epiteliali, soprattutto perché i suoi diversi stadi di sviluppo sono più facilmente identificabili e analizzabili rispetto ad altri tipi di tumore. La maggior parte dei carcinomi colorettali si sviluppa a partire da lesioni inizialmente benigne, i polipi adenomatosi, che con il passare del tempo si accrescono e le loro cellule cominciano ad accumulare un certo numero di mutazioni che porteranno alla trasformazione maligna (Fig. 1.1). Numerosi dati in letteratura tendono a distinguere due principali pathways genetici nella tumorigenesi del CRC: uno chiamato “Chromosome instability (CIN)”, l'altro “Microsatellite Instability (MIN)”. Quest'ultimo fenotipo è stato riscontrato in forme di carcinoma coloretale ereditario non-poliposiche (HNPCC) (Ionov et al, 1993; Thibodeau et al, 1993) e le alterazioni possono coinvolgere geni implicati nella riparazione di danni al DNA del tipo mismatch repair (MMR) come hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 (Bronner et al. 1994) oppure ad esempio, il gene che codifica per il TGF- β (Markowitz et al. 1995) o il fattore pro-apoptotico Bax (Rampino et al. 1997) i quali contengono entrambi microsatelliti.

In generale il CIN è un tipo di instabilità genomica che genera delezioni, aneuploidia e traslocazioni, ed è comunque responsabile della maggior parte delle mutazioni cromosomali nelle cellule tumorali (Jefford et al., 2006). Nel CRC il pathway CIN causa la perdita fisica di oncosoppressori, nelle fasi della formazione degli adenomi (fase in cui il tumore è benigno) e nel passaggio da adenoma a carcinoma (tumore maligno) (Takayama et al., 2006). La poliposi adenomatosa ereditaria (FAP) è un esempio di CRC la cui evoluzione può essere spiegata

attraverso il pathway CIN. Il modello di sviluppo della FAP che venne proposto per la prima volta da Vogelstein prevede diverse fasi. Il primo stadio del differenziamento in fenotipo tumorale è la trasformazione di un epitelio normale in epitelio iperplastico, e in questa fase si riscontrano quasi sempre mutazioni o delezioni del gene APC (FAP), localizzato sul braccio q del cromosoma 5 e implicato nel pathway regolato dal fattore Wnt. In assenza di Wnt, la proteina β -catenina risulta associata ad APC che ne promuove la degradazione tramite proteosoma. In seguito all'attivazione, da parte di Wnt, del recettore Frizzled e, di conseguenza, della proteina scaffold Disheveled, la β -catenina viene dissociata ad APC e quindi è libera di traslocare nel nucleo, dove, interagendo con i fattori TCF/LEF1 attiva la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare. Si è osservato che in seguito alla delezione del gene APC, la costante assenza della sua proteina fa sì che la β -catenina sia sempre libera di traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione. Tutto ciò porta alla formazione di un adenoma precoce, poi di un adenoma intermedio, che presenta spesso mutazioni attivanti del gene K-ras, nel braccio q del cromosoma 12 e di un adenoma avanzato, con delezioni dei geni DCC e SMAD4, nel braccio q del cromosoma 18, implicato nel pathway anti-proliferativo mediato dal TGF- β che porta, proprio per attivazione delle proteine SMAD, all'espressione di inibitori delle cicline come p15 e p21. L'ultimo stadio della progressione tumorale è rappresentato, infine, da un carcinoma, che in genere ha mutazioni o delezioni del gene p53, localizzato nel braccio p del cromosoma 17, codificante per una proteina implicata nel checkpoint di controllo del ciclo cellulare e nella regolazione dell'apoptosi (Fearon e Vogelstein, 1990). Ulteriori alterazioni come ad esempio mutazioni attivanti il gene codificante per la MMP-7 o Matrilisina (Ishikawa et. al, 1996) o down-regulation dell'espressione delle E-caderine (Matsuura et al, 1992), possono, in seguito, conferire al carcinoma la capacità di originare metastasi. Questa sequenza di eventi, dunque, essendo caratterizzata dalla perdita di alleli su diversi cromosomi (5q; 12q; 7p; 18q), è conosciuta come pathway dell'instabilità cromosomale (CIN).

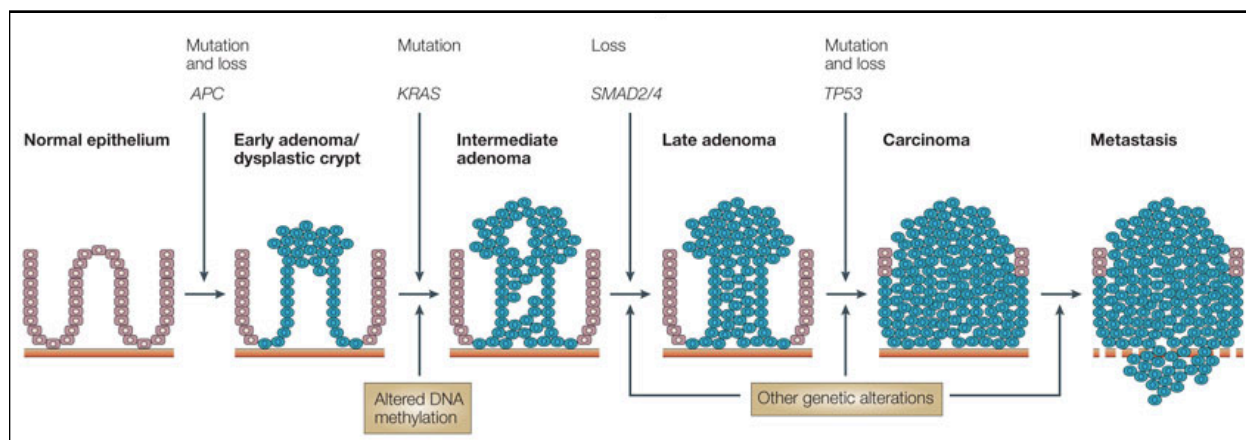


Fig. 1.1. Progressione del carcinoma coloretale secondo il modello proposto da Vogelstein.

Un altro percorso che può portare all'insorgenza di un carcinoma del colon-retto è caratterizzato dalla duplicazione o delezione di piccole sequenze di DNA ripetute in tandem, dette microsatelliti, la cui alterazione può danneggiare geni che possono essere implicati nella regolazione del ciclo cellulare. Per questa ragione tale processo viene definito pathway dell'instabilità dei microsatelliti (MIN). Il fenotipo MIN è stato riscontrato spesso nelle forme di carcinoma coloretale ereditario non-poliposiche (HNPCC), dovuto nella maggior parte dei casi a mutazioni germinali in geni come hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 che codificano per proteine coinvolte nel riparo del DNA di tipo "mismatch repair" (MMR). Queste sono in grado di riparare gli errori a cui sono spesso soggette le sequenze microsatelliti, per la loro natura, durante la replicazione del DNA; infatti durante la fase S del ciclo cellulare si può verificare, un fenomeno di slittamento della DNA polimerasi, cioè si possono formare forcine a singola elica a livello dei microsatelliti, che estromettendosi dalla struttura della doppia elica, causano la variazione del numero di ripetizioni. Queste forcine vengono normalmente rimosse dalle proteine dell'MMR; quindi proprio da questo sistema e da una corretta replicazione del DNA vengono mantenuti i microsatelliti.

L' HNPCC è una patologia in cui il paziente eredita la mutazione di un solo allele di uno dei geni dell'MMR. L'inattivazione del secondo in una cellula somatica induce la comparsa di un fenotipo ipermutabile che accelera l'accumulo di mutazioni in numerosi geni e quindi il processo di cancerogenesi (Markowitz et al., 2002).

Il MIN è inoltre presente in una significativa percentuale di carcinomi coloretali sporadici; in particolare tra questo tipo di tumori il 10-20% presenta un'elevata frequenza di instabilità dei microsatelliti (H-MIN), mentre il 5-50% presenta una bassa frequenza (L-MIN). I primi, inoltre presentano delle evidenti differenze istopatologiche, rispetto ai CRC sporadici con L-MIN e a quelli con stabilità dei microsatelliti (MSS); tali differenze comprendono un fenotipo mucinoso e un'eccessiva infiltrazione dei linfociti nella massa tumorale (Takayama et al., 2006).

Recenti studi tuttavia tendono a dimostrare che la tumorigenesi del CRC non sempre può essere distinta sulla base di questi due pathways, i quali non sono mutualmente esclusivi, ma anzi un sottogruppo di CRC si sviluppano e progrediscono attraverso sia MIN che CIN; ad esempio alcuni CRC sporadici presentano MIN-H e delezione di APC o p53. Quindi possono esistere dei “cross talk” tra i due pathway che stanno a sottolineare la complessità dell'insorgenza del CRC; ad esempio in alcuni CRC con MIN, si sono riscontrati sia mutazioni nei microsatelliti presenti nel gene del recettore II di TGF- β , un repressore della proliferazione cellulare, che la delezione del gene APC.

Recenti studi di biologia molecolare rivelano come i meccanismi epigenetici rivestono un importante ruolo nella tumorigenesi del CRC; in particolare, regioni ricche in CpG all'estremità 5' di sequenze codificanti possono essere sottoposte a ipermetilazione la quale causa il silenziamento dei geni in questione. Diversi CRC sono caratterizzati da un fenotipo CIMP (CpG island methylator phenotype), ovvero presentano molti geni silenziati in seguito a ipermetilazione, come ad esempio hMLH1, APC, il gene che codifica il recettore degli estrogeni (ER), p16INK4A eccetera (Lind et al., 2004).

1.3 L'ONCOGENE RAS

La proteina RAS appartiene alla superfamiglia delle GTPasi monomeriche le quali mediano una moltitudine di processi cellulari mediante la conversione di stimoli extracellulari in specifiche risposte biologiche tra cui: proliferazione, senescenza, differenziamento e sopravvivenza. Ne sono state identificate, nell'uomo, diverse isoforme, in particolare tre geni ras codificano per quattro isoforme, H-Ras (Harvey), K-Ras4A, K-Ras4B (Kirsten) e N-Ras (Neuroblastoma). Differenze tra le isoforme, incluse modifiche post-traduzionali e localizzazione intracellulare, hanno reso la proteina Ras un importante modello per lo studio della compartimentalizzazione del segnale e della biologia della membrana. Infatti, isoforme di Ras in diversi compartimenti sub-cellulari sono in grado di reclutare proteine accessorie differenti e attivare molteplici cascate di segnalazione. I diversi geni ras umani hanno una struttura comune: un primo esone non codificante e quattro esoni codificanti. Gli introni differiscono sia per dimensioni sia per sequenza ma possiedono siti di splicing conservati. I promotori di tutti e tre i geni sono privi di TATA box ma posseggono sequenze a monte ricche in elementi GC necessari per l'espressione (Lowy et al. 1993). I prodotti proteici hanno un peso molecolare di 21 kDaltons e contengono tutti 188 aa, a eccezione dell'isoforma K-Ras4A che invece ne ha 189. Inoltre, le proteine codificate dai tre geni ras umani sono omologhe per i primi 165 aa e divergenti per gli ultimi 25 aa C-terminali. Questi ultimi rappresentano una regione ipervariabile (HVR) che termina con un motivo CAAX (dove C= cisteina; A= aminoacido alifatico e X= serina o metionina); tale sequenza va incontro a una serie di modifiche post-traduzionali necessarie per il legame della proteina, altrimenti solubile, alla membrana plasmatica (Fig. 1.2).

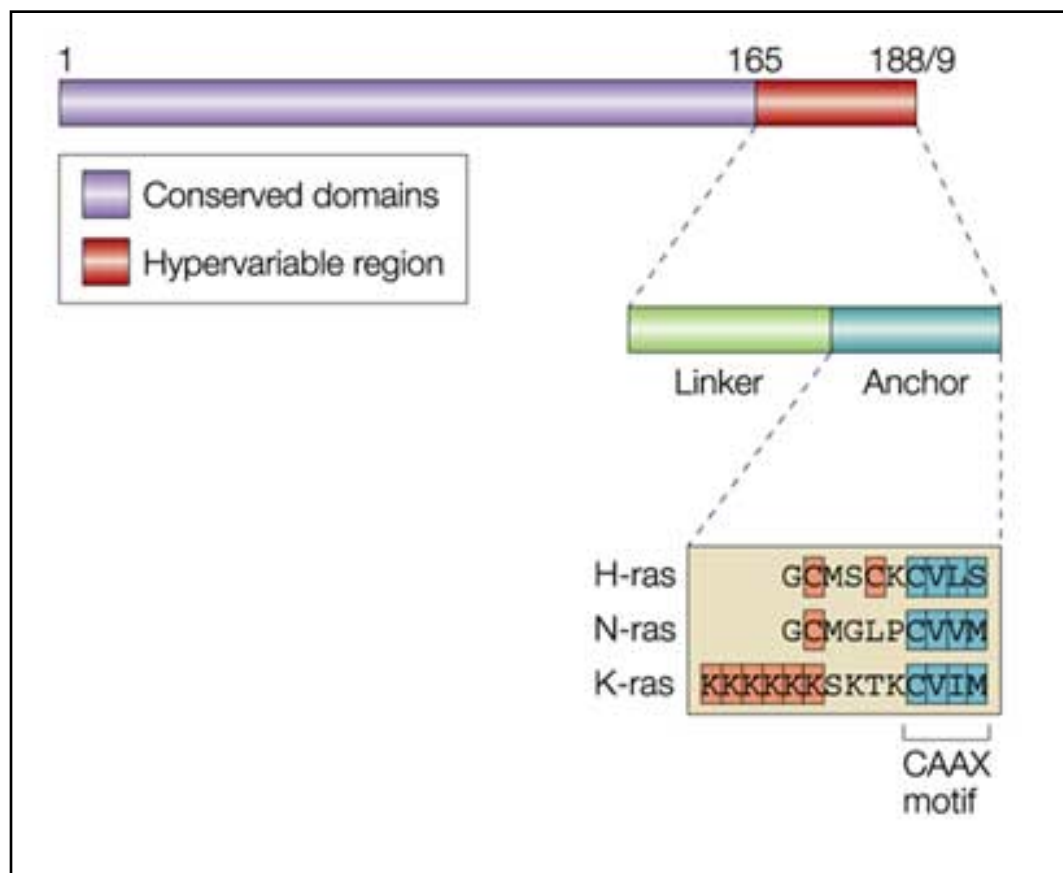


Fig. 1.2. Rappresentazione schematica della regione ipervariabile (HVR) delle diverse isoforme di Ras.

In particolare, la cisteina in posizione 185 viene prenilata da una proteina farnesil-transferasi nel citoplasma, questo facilita il legame alla membrana del reticolo endoplasmatico rugoso, successivamente il motivo AAX viene rimosso da un “enzima che converte RAS” (Rce1) e, infine, la cisteina farnesilata viene metilata da una isoprenil-cistein-carbossimetil-transferasi (Icmt) (Wright et. al., 2006). Il gruppo farnesile fornisce solo una debole affinità per la membrana e pertanto ciascuna isoforma viene specificatamente veicolata e micro-localizzata nella corretta regione di membrana grazie a ulteriori modifiche. Per quanto riguarda K-Ras4B, il segnale di localizzazione è rappresentato da un dominio polibasico, una sequenza di sei lisine compresa tra i residui aminoacidici 175 e 180. Per le altre tre isoforme il segnale consiste invece nella palmitoilazione di residui di cisteine: cisteina 180 per K-Ras4A; cisteina 181 per N-Ras; cisteine 181 e 184 per H-Ras. La diversa composizione lipidica delle ancore delle isoforme di

RAS è, dunque, responsabile della loro localizzazione in subdomini differenti della cellula. Esistono, infatti, pool intracellulari di proteine RAS associati a diversi organelli tra cui: reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi (Choy et. al. 1999); endosomi (Howe et. al. 2001); mitocondri (Bivona et. al. 2006); nucleo (Guil et. al. 2003). Tuttavia, classicamente, la funzione di RAS è associata alla membrana cellulare e si ritiene che proprio la localizzazione delle sue diverse isoforme nei vari micro-domini della membrana plasmatica sia all'origine della molteplicità di risposte cellulari da esse generate. In particolare i gruppi palmitoilici di H-Ras e N-Ras mediano una forte associazione con le "lipid rafts" (regioni di membrana con una caratteristica composizione sfingolipidica) mentre i gruppi farnesilici di K-Ras non hanno particolare affinità per le zattere lipidiche (lipid rafts) ricche di grassi saturi e pertanto mediano associazioni con regioni "non-raft" della membrana. Inoltre, esperimenti di microscopia elettronica hanno evidenziato che in seguito ad attivazione, H-Ras si sposta dalle lipid rafts traslocando in regioni non raft in cui si organizza a formare domini di segnalazione sulla superficie di membrana (Prior et. al. 2003). Le diverse isoforme di RAS, quindi, si associano preferenzialmente a differenti organelli e microdomini di membrana in base al tipo di ancora lipidica, di modifica post-traduzionale e allo stato di attivazione e questa localizzazione differenziale le pone in contatto con gruppi distinti di effettori e attivatori permettendo la trasduzione di molteplici segnali.

La proteina RAS, è stata paragonata a un interruttore molecolare che si trova in uno stato inattivo quando lega il nucleotide guanilico GDP e viene attivato quando un fattore di scambio del nucleotide guanilico (GEF) stimola la dissociazione del GDP, permettendone un rapido scambio con il più abbondante GTP. I cambiamenti allosterici causati dal legame del GTP incrementano l'affinità delle interazioni con gli effettori prima che il nucleoside trifosfato sia nuovamente convertito in GDP da proteine attivanti le GTPasi (GAPs) che stimolano la debole attività GTPasica intrinseca di RAS. Le differenze tra i due stati (attivo/inattivo) si riscontrano soprattutto nelle regioni Switch I (residui 30-38) e Switch II (residui 60-76) e a livello del loop P (residui 10-17) che oltre, a contenere il motivo GxGGxGKS/T, presenta una struttura analoga a quella ritrovata in altre proteine, incluse GTPasi, ATPasi e chinasi e funzionalmente viene considerato il sito di legame al trifosfato. Qualunque sostituzione della glicina in posizione 12

con un aminoacido avente una catena laterale di maggiori dimensioni, interferisce per ingombro sterico con il cambiamento conformazionale e l'attività GTPasica indotta dall'interazione con GAP. Il loop P, inoltre contiene il residuo Gly13 che se mutato rende RAS costitutivamente attiva. Quindi sostituzioni aminoacidiche a livello dei residui Gly12 e Gly13 sono oncogene e rappresentano le mutazioni più frequenti nei tumori in cui RAS è alterato. A livello della regione Switch II si trova un altro dei punti caldi della proteina: il residuo Gln 61, il quale è necessario per catalizzare l'idrolisi del GTP poiché la sua catena laterale forma un legame a idrogeno con uno specifico residuo (Arg789) di GAP consentendo l'attacco nucleofilo di una molecola d'acqua, cruciale per l'idrolisi del GTP. L'attivazione del pathway di Ras si ottiene quando una molecola segnale si lega a un recettore tirosina chinasi come ad esempio il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) o il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR). In questo modo viene indotta l'oligomerizzazione del recettore, l'attivazione della sua attività chinasi e la transfosforilazione del dominio citoplasmatico. Tale dominio fosforilato viene riconosciuto da proteine adattatrici, come ad esempio Grb2, che vengono quindi reclutate sulla membrana richiamando, a loro volta, tramite un dominio SH3, proteine GEFs come SOS-1 o CDC25 (Schlessinger 2006). Sono queste ultime, dunque, che infine interagiscono con Ras e, stimolando lo scambio tra GDP e GTP, determinano l'attivazione dei pathways a valle (Fig 1.3).

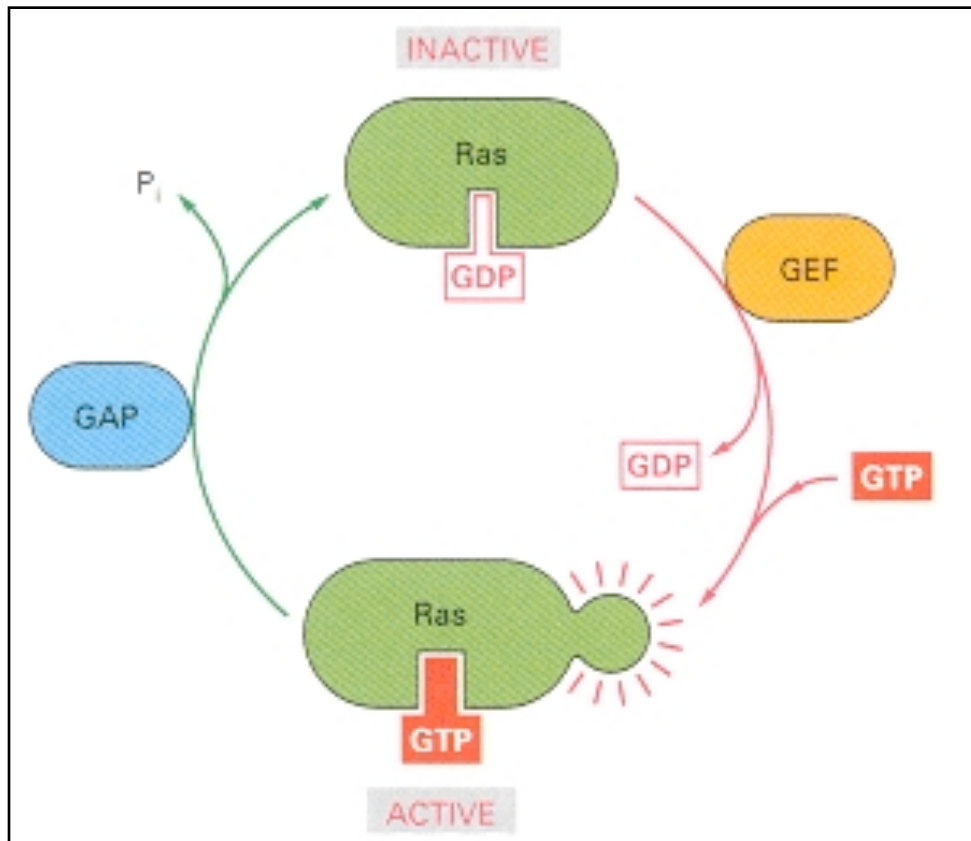


Fig. 1.3. Rappresentazione schematica del ciclo di attivazione (legame al GTP) e di disattivazione (legame al GDP) di Ras con l'intervento di proteine GEF (Fattori di scambio del nucleotide guanilico) e GAP (Proteine attivanti le GTPasi).

Ras attivata può infatti originare diverse cascate di trasduzione del segnale mediante diversi effettori i quali servono a regolare un elevato numero di funzioni cellulari che comprendono la crescita, il differenziamento, la sopravvivenza e l'angiogenesi. Gli effettori meglio caratterizzati fino a ora appartengono alla famiglia di chinasi serina/treonina Raf e alla famiglia delle PI3K (Fosfatidilinositolo3-chinasi). La traslocazione in membrana di Raf da parte di Ras determina la fosforilazione della proteina MAPKK che a sua volta fosforila e attiva proteine quali ERK1 ed ERK2. Molti fattori che, infine, vengono fosforilati dalle proteine ERK sono stati implicati nella trasformazione indotta da RAS e comprendono fattori di trascrizione e chinasi quali Elk-1, c-Ets1, c-Ets2, p90RSK1, MNK1, MNK2 (Adjei 2006). La traslocazione in membrana della PI3K invece genera un pathway più complesso in cui il Fosfatidilinositolo-3,4-bifosfato viene convertito in Fosfatidilinositolo-3,4,5-bifosfato. Tali lipidi specializzati servono a richiamare proteine contenenti domini PH (Pleckstrin Homology) quali PDK e AKT e quest'ultima, in

seguito ad attivazione mediante fosforilazione da parte della PDK, svolge il ruolo chiave nella cascata di segnalazione attivando, mediante fosforilazione su residui di serina/treonina, fattori che regolano importanti funzioni cellulari quali il metabolismo del glucosio, sopravvivenza e proliferazione cellulare.

1.4 RAS E TUMORIGENESI

Ras è uno degli oncogeni più frequentemente mutati nei tumori umani. L'incidenza di mutazioni delle isoforme K-Ras, H-Ras e N-Ras è tessuto e tumore specifica. In particolare, N-ras è più frequentemente mutata nelle leucemie e H-ras nei tumori alla vescica, mentre alterazioni dell'isoforma K-Ras sono state riscontrate nel 90% dei carcinomi al pancreas, nel 30% di quelli ai polmoni, nel 50% dei tumori al colon e raramente nei carcinomi alla mammella e alle ovaie (Bos et al., 1989).

In tutte le isoforme, le alterazioni trasformanti riguardano i domini funzionali di Ras implicati nel legame del nucleotide, legame con l'effettore, legame con GAP. Tali mutazioni sono puntiformi e si riscontrano quasi sempre nei codoni 12, 13 (entrambi codificanti per una glicina nel wildtype) o 61 (codificante per una glutammina nel wild type). In ogni caso, esse riducono notevolmente o aboliscono l'attività GTPasica di Ras.

È evidente come alterazioni che rendono Ras costitutivamente attivo, interferendo con la capacità delle GAPs d'interagire con esso, possano modificare i normali pathways di segnalazione cellulare predisponendo la cellula alla trasformazione. RAS attivato, infatti, interagisce con un elevato numero di effettori in grado di regolare molteplici funzioni cellulari; oltre a RAF e alla fosfatidilinositolo3-chinasi (PI3K), i primi due effettori di RAS identificati, che come si è detto provocano rispettivamente proliferazione cellulare e differenziamento attraverso la cascata delle MAP-chinasi, e sopravvivenza e blocco dell'apoptosi, sono stati inoltre identificati altri effettori che sono implicati in pathways di segnalazione che coinvolgono il riarrangiamento dell'organizzazione del citoscheletro, il traffico di membrana, la migrazione cellulare e il ciclo cellulare (Fig. 1.4).

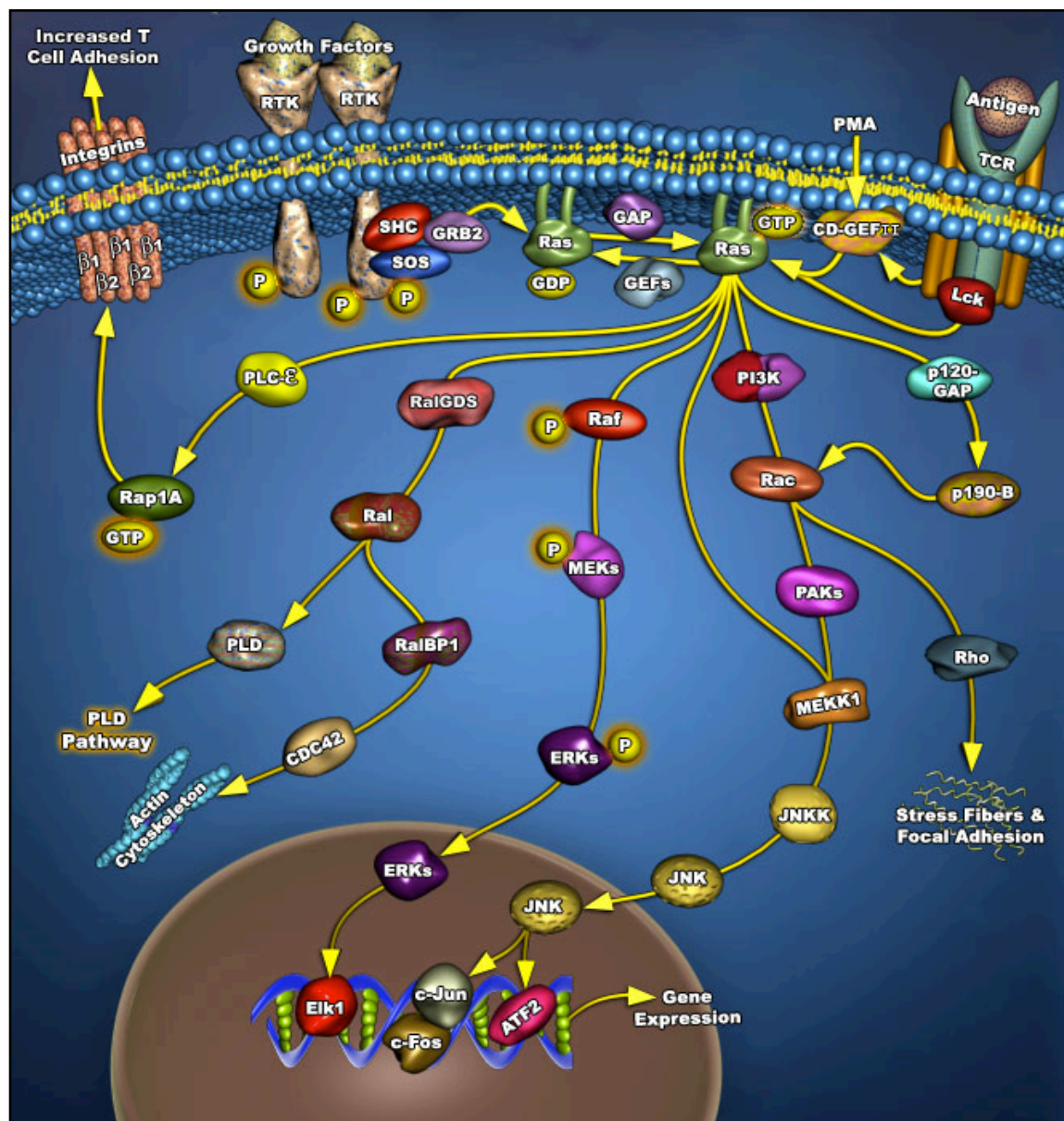


Fig. 1.4. Rappresentazione schematica dei pathways in cui e' coinvolta la proteina Ras.

I due pathways principali (Raf e PI3K) rappresentano per le diverse isoforme di RAS, insieme con la differente localizzazione in microdomini di membrana, un ulteriore elemento di variabilità nelle risposte cellulari da esse mediate. Esperimenti di frazionamento sub-cellulare e successiva co-immunoprecipitazione hanno infatti dimostrato una diversa affinità delle isoforme H-Ras e K-Ras per le proteine RAF e PI3K. In particolare H-Ras sembra attivare maggiormente il pathway

della PI3K mentre K-Ras sembra essere un migliore attivatore della cascata di MAPK mediata da RAF (Yan et. al. 1998).

L'attivazione aberrante delle isoforme di RAS produce, attraverso l'intervento di fattori diversi, conseguenze biologiche differenti per la cellula. Esse sono, dunque, funzionalmente distinte e per tale motivo si riscontrano mutazioni attivanti le singole isoforme associate a tipi di carcinomi differenti.

Mutazioni attivanti di RAS però non sempre si traducono in una maggiore spinta della proliferazione cellulare, ma possono provocare effetti differenti, a volte apparentemente contrastanti; ciò dipende dal contesto genico della cellula in cui tali alterazioni si manifestano, dal tipo di segnalazioni a cui tale cellula è sottoposta e dal tipo di risposte che essa è in grado d'innescare. Pertanto mutazioni in RAS potranno indurre effetti diversi dalla iperproliferazione come ad esempio, arresto del ciclo cellulare e senescenza. Esistono infatti evidenze sperimentali, sia *in vitro* che *in vivo*, che suggeriscono che l'attivazione aberrante di Ras, e dunque dei pathways di Raf e PI3K, determina l'instaurarsi di circuiti a feedback negativo mediati da p53 e RB che indirizzano la cellula verso uno stato di senescenza. Tale evento è noto come "senescenza oncogene-indotta" (OIS) per distinguerlo dal fenomeno della senescenza replicativa che è, invece, un processo fisiologico determinato dalla progressiva erosione dei telomeri a ogni evento di replicazione cellulare (Courtois-Cox, 2006). La OIS, così come il fenomeno noto come apoptosi oncogene-indotta, sono considerati meccanismi di difesa messi in atto quando la cellula non è in grado di riparare un eventuale danno subito.

Data la complessità dei pathways mediati da RAS, esistono diversi punti verso cui possono essere indirizzate le strategie anti tumorali: inibizione dell'espressione delle proteine Ras mediante, ad esempio, la tecnologia dell'interferenza dell'RNA (RNAi); inibizione della localizzazione sulla membrana cellulare mediante l'utilizzo di inibitori della Farnesiltransferasi (FTIs) e della geranilgeraniltransferasi; inibizione delle interazioni tra Ras e GEFs o stimolazione delle interazioni tra Ras e GAPs; infine, è possibile intervenire bloccando gli effettori a valle di Ras quali Raf e MAPK utilizzando specifici inibitori (Adjei 2006).

1.5 RAS E CICLO CELLULARE

La divisione cellulare consiste di due processi consecutivi principalmente caratterizzati dalla replicazione del DNA e dalla segregazione dei cromosomi duplicati in due cellule separate. La mitosi (fase M) e' il processo di divisione cellulare; l'intervallo che intercorre tra due fasi M viene definito interfase. La replicazione del DNA avviene durante uno specifico momento dell'interfase chiamato fase S. Quest'ultima e' preceduta da un periodo di pausa (Gap) chiamato G1 durante il quale la cellula si prepara per la sintesi del DNA ed e' seguita da un altro periodo di pausa chiamato G2 durante il quale la cellula si prepara per la mitosi. Le cellule in G1, se non ricevono segnali mitogenici, possono entrare in uno stato di quiescenza chiamato G0.

La transizione da una fase del ciclo cellulare a un'altra avviene in maniera ordinata ed è regolata da numerosi fattori proteici (Fig 1.5).

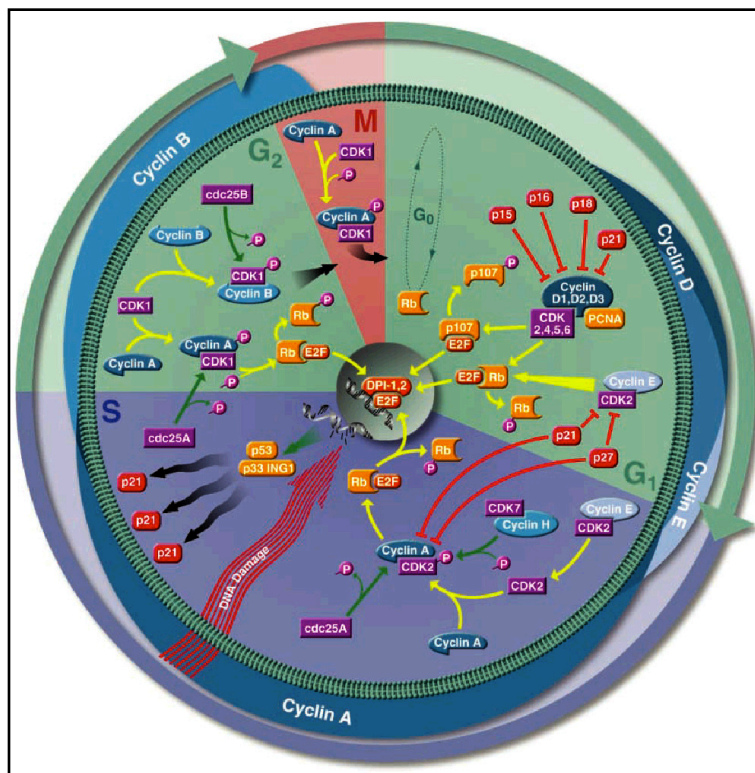


Fig. 1.5. Rappresentazione schematica del ciclo cellulare e delle proteine in esso coinvolte. In rosso sono evidenziati i fattori coinvolti nella regolazione dei checkpoint di controllo.

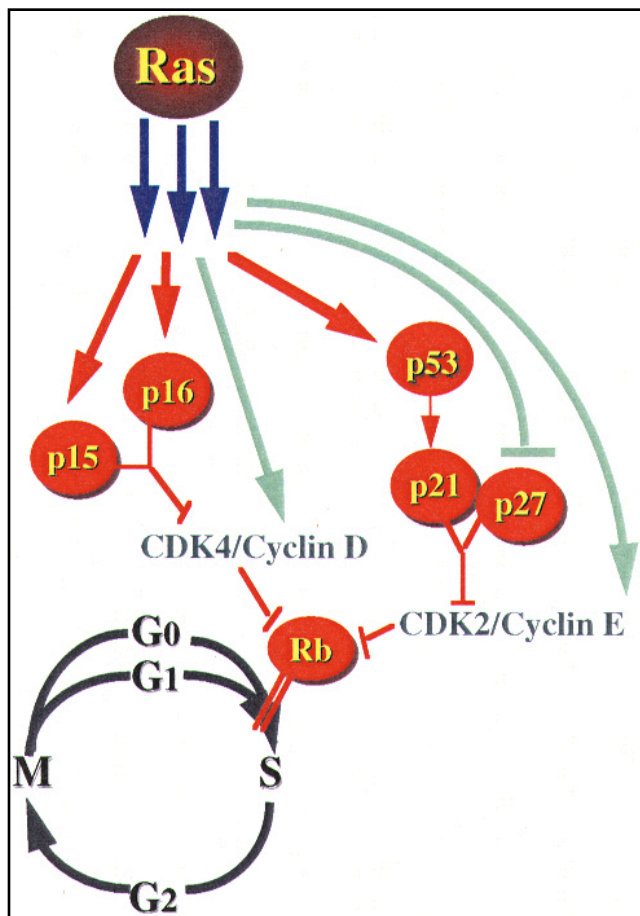
I regolatori chiave sono le protein-chinasi ciclina-dipendenti (CDKs), una famiglia di chinasi serina/treonina che sono attivate in momenti specifici del ciclo. Una volta attive, le CDK

inducono diversi processi a valle mediante la fosforilazione di specifiche proteine (Morgan 1995). I livelli di espressione delle CDK rimangono costanti durante il ciclo cellulare, al contrario dei livelli delle proteine che le regolano: le cicline. Il livello di espressione delle cicline infatti aumenta o diminuisce durante la progressione della cellula attraverso il ciclo e in questo modo esse sono in grado di attivare periodicamente le CDK. Cicline differenti sono richieste durante le varie fasi del ciclo; la ciclina D lega le CDK4 e CDK6 formando un complesso necessario per l'ingresso in G1. Durante questa fase, tale complesso fosforila il prodotto del gene soppressore del retinoblastoma (pRb) che nello stato iper-fosforilato determina il rilascio di fattori di trascrizione, quali E2F e DP-1, che a loro volta regolano positivamente la trascrizione di geni i cui prodotti sono essenziali per la progressione nella fase S (Buchkovich et al. 1989). Quest'ultima è regolata anche da un ulteriore complesso costituito dalla ciclina E e la CDK2, tale complesso contribuisce a mantenere la proteina repressore RB in uno stato iper-fosforilato e dunque inattiva. Durante la fase G2, invece, la ciclina A lega la CDK1 per promuovere l'ingresso in fase M.

L'attivazione di un proto-oncogene come Ras in seguito a mutazione e la stimolazione aberrante che ne deriva potrebbe, dunque, essere da sola in grado di promuovere una proliferazione cellulare incontrollata.

Tuttavia, per assicurare un processo di replicazione del DNA senza errori e una corretta segregazione dei cromosomi, la cellula ha evoluto dei meccanismi di controllo che assicurano la giusta e ordinata sequenza di eventi del ciclo cellulare. Esistono infatti diversi punti di controllo, i checkpoints, generalmente regolati dalla proteina p53. In seguito ad un danno al DNA oppure ad uno stimolo proliferativo aberrante vengono attivati fattori, chiamati inibitori delle CDK (CDKI), in grado di interferire con l'azione delle cicline legando le CDK da sole o i complessi ciclina-CDK. Esistono due famiglie di CDKI, la famiglia delle INK4 comprende p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d) che intervengono durante la fase G1 prevenendo il legame tra ciclina e CDK. Gli inibitori della seconda famiglia, Cip/Kip, includono p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2) e inibiscono l'azione dei complessi ciclina-CDK (Polyak et al. 1994). p21 è anche in grado di inibire la sintesi del DNA mediante l'inattivazione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) (Pan et al. 1995). p21 è direttamente regolato da

In conclusione, lo stimolo oncogenico e' bilanciato dai meccanismi di controllo e difesa della cellula come mostrato in Fig. 1.6 e sarà in grado di determinare una trasformazione tumorale solo quando questo meccanismo risulta alterato.



La base genetica del tessuto e della cellula in cui viene attivato un oncogene e' fondamentale per lo sviluppo di un carcinoma. Per questo motivo all'interno di un tessuto di solito si riscontrano alterazioni a carico di alcuni fattori ma non di altri.

Mutazioni a carico di K-Ras sono ad esempio molto frequenti nel carcinoma coloretale dove, come descritto già in questa relazione, svolgono un ruolo fondamentale durante la sua progressione ma risultano infrequenti in altri tipi di tumore. Mutazioni a carico di H-Ras determinano nel carcinoma mammario proliferazione incontrollata e conferiscono una particolare aggressività (Datta et al. 2007).

Ras agisce generalmente da oncogene trasformante, anche se studi recenti hanno evidenziato che in fibroblasti umani e in alcune linee cellulari, RAS è in grado di inibire la proliferazione cellulare; inoltre, l'espressione ectopica di H-RasG12V in cellule di altri tipi di carcinoma può determinare senescenza o apoptosi (Denoyelle et al. 2006). In realtà non è chiaro se l'arresto della crescita cellulare indotta da oncogeni sia un meccanismo fisiologico protettivo adottato dalle cellule per ridurre l'incidenza di tumori nei mammiferi, oppure sia un artefatto dovuto all'iperespressione di potenti molecole di segnalazione in sistemi di coltura ricchi di siero e ossigeno. Recenti evidenze sperimentali sembrano propendere per l'ipotesi che l'arresto della crescita indotto da oncogeni abbia un significato funzionale in vivo (Nicke et al., 2005).

Due sono i meccanismi conosciuti attraverso i quali RAS esercita il suo effetto antiproliferativo. Nel primo, H-RAS attivando Raf, regola positivamente l'espressione degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti p16INK4a e p15INK4b, i quali bloccano la fosforilazione di pRB e quindi la progressione della cellula in G1. Inoltre RAS attiva l'espressione di p14ARF, che inattiva Mdm2, lasciando p53 libero di agire e di attivare p21.

Studiare e comprendere i meccanismi molecolari che determinano effetti così diversi tra loro potrebbe aiutare la messa a punto di nuove strategie anti-tumorali sempre più specifiche ed efficaci.

1.6 RAS, APOPTOSI E SENESCENZA.

Il potenziale oncogenico della proteina Ras attivata e' dovuto, in parte, alla sua capacita' di incrementare la sopravvivenza cellulare promuovendo l'attivita' di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 o Bcl-XL e reprimendo l'espressione di fattori pro-apoptotici come Bad o Bim. Paradossalmente, esistono numerose evidenze sperimentali che evidenziano la capacita' delle diverse isoforme di Ras di attivare fenomeni di senescenza o apoptosi in particolari condizioni.

La morte cellulare programmata, o apoptosi, e' un meccanismo cellulare fisiologico che si basa sull'attivazione controllata di caspasi o nucleasi che portano alla morte della cellula interessata senza coinvolgere quelle circostanti. Esistono due pathways che possono generare apoptosi: quello intrinseco regola l'attivita' delle proteine della famiglia Bcl-2 che controllano l'integrita' della membrana mitocondriale. Il rilascio nel citoplasma di fattori pro-apoptotici dal mitocondrio, come il citocromo c, promuove l'attivazione della caspasi 9 che successivamente attiva effettori quali la caspasi 3 e la caspasi 7. Il pathway estrinseco si basa invece sull'attivazione dei recettori di morte che reclutano e attivano la caspasi 8 attraverso proteine adattatrici quali FADD (Fas-associated death domain) o TRADD (TNFRSF1A-associated via death domain) (Cagnol and Chambard, 2009).

Dati presenti in letteratura documentano la capacita' del pathway Ras/Raf/ERK di determinare apoptosi stimolando, in base al tipo cellulare, sia il pathway intrinseco (Zhang et al., 2003; Li et al., 2005) che quello estrinseco (Nesterov et al., 2004; Yang et al., 2008).

La senescenza, al contrario dell'apoptosi, e' una forma di arresto del ciclo cellulare che previene la proliferazione delle cellule danneggiate. In risposta a stimoli iper-proliferativi (Ras, Myc) alcune cellule, normali e tumorali, entrano in uno stato di senescenza indotta dagli oncogeni (OIS) (Serrano et. 2007). Il pathway della senescenza si basa, di solito, sull'attivazione della proteina p16 (INK4a) che, tramite inibizione di complessi CDK4/6- ciclina D, determina l'ipofosforilazione di pRb e dunque l'arresto del ciclo cellulare. Un ulteriore meccanismo si basa, invece, sull'attivazione della proteina p14^{ARF} che porta alla stabilizzazione di p53 che, a sua volta, e' in grado di determinare apoptosi o arresto del ciclo cellulare mediante l'attivazione di

p21 (Waf1, Cip1) (Bringold and Serrano 2000). In alcuni sistemi cellulari, l'attivazione aberrante di Ras può indurre p21 in maniera p53-indipendente (Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997). Recentemente e' stato proposto che alla base dei processi di apoptosi e senescenza possa esserci un altro meccanismo cellulare fisiologico noto come autofagia. Tale processo e' stato inizialmente identificato come un meccanismo di sopravvivenza messo in atto dalla cellula al fine di proteggersi dalla deprivazione di nutrienti. Tuttavia, in certe condizioni, l'autofagia può risultare in una forma di morte cellulare nota come morte cellulare programmata di tipo II in cui la cellula assume una forma arrotondata e si assiste alla formazione di vacuoli citoplasmatici che spingono il nucleo e il citoplasma verso la membrana plasmatica (Maiuri et al., 2007). Diversi studi hanno associato il pathway di Ras/Raf/ERK all'induzione di morte cellulare programmata mediante autofagia (Subramanian, 2006; Ellington et al. 2006). È stato recentemente riportato in letteratura che anche l'instaurarsi di un processo di senescenza può essere mediato da autofagia e, in questo caso, sarebbe coinvolto il pathway di Ras/PI3K/AKT. In particolare, secondo tale modello, schematizzato nella figura 1.7, l'attivazione di un oncogene porterebbe inizialmente ad iper-proliferazione e, solo dopo alcuni giorni, arresto del ciclo cellulare.

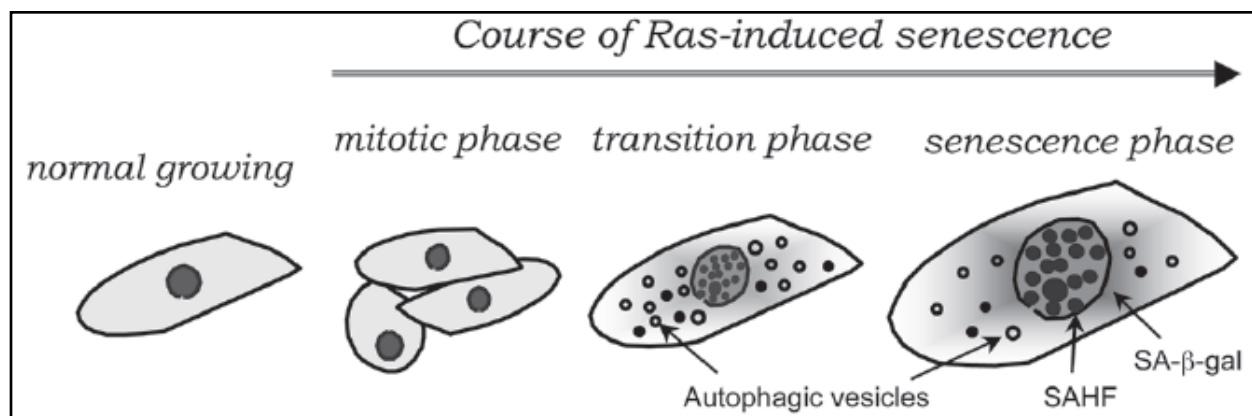


Fig. 1.7. Autofagia durante la senescenza indotta da oncogeni. L'attivazione di un oncogene induce una rapida proliferazione cellulare (fase mitotica). L'autofagia e i cambiamenti morfologici che avvengono durante la fase di transizione guidano la cellula verso la fase di senescenza.

Tra questi due estremi e' presente una fase di transizione durante la quale si riscontrano i maggiori cambiamenti dal punto di vista morfologico e della regolazione trascrizionale. Proprio

durante questa fase viene attivato il meccanismo di autofagia che porterebbe alla senescenza (Narita et al., 2009; Young et al., 2009). I meccanismi molecolari attraverso i quali tale meccanismo viene attivato non sono del tutto chiari. È possibile, tuttavia, ipotizzare un ruolo di tumor-suppressor per l'autofagia che è in grado di promuovere un rapido turn over delle proteine facilitando in questo modo la sintesi di fattori necessari per l'induzione dei meccanismi apoptotici o di senescenza.

2. PREMESSA E SCOPO DELLA RICERCA

Nel laboratorio presso il quale ho svolto il mio progetto di dottorato, analisi condotte sul DNA prelevato da 160 pazienti con carcinoma coloretale primario, hanno mostrato nel 46% dei casi mutazioni nell'isoforma K-RAS : 54% nel codone 12, 42% nel codone 13 e 4% in entrambi i codoni. In particolare queste analisi hanno indicato che mutazioni puntiformi nel codone 12 di K-RAS sono associate ad un fenotipo tumorale mucinoso, mentre mutazioni nel codone 13, quasi assenti in questo sottotipo di CRC, sono associate ad un'incrementata attività proliferativa e aggressività delle cellule cancerose. Dal momento che RAS è coinvolta in numerosi processi cellulari, è possibile che mutazioni in posizioni differenti influenzino i vari pathways in maniera diversa. Per verificare tale ipotesi, presso il laboratorio dove svolgo il mio progetto di ricerca, sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma coloretale, le HT-29, le quali secondo dati riportati in letteratura presentano alterazioni nella struttura e nell'espressione di alcuni geni che regolano il ciclo cellulare e l'apoptosi. In particolare esse presentano un allele di p53 deletato (Gayet et al., 2001) e uno mutato in posizione 273 in cui una arginina è sostituita da un residuo di istidina, tale mutazione ricade all'interno di un dominio di legame al DNA (Saintigny et al. 1999). Le HT-29 inoltre presentano una mutazione B-RAF^{V600E} ma non presentano mutazioni a carico di K-ras e H-Ras (Gayet et al., 2001). Tali cellule sono state stabilmente trasfettate con i cDNA codificanti per le isoforme H-RAS e K-RAS mutate nel codone 12 (H-RAS G12V, K-RAS G12V) e K-RAS mutata nel codone 13 (K-RAS G13D), sotto il controllo di un promotore ormone-inducibile [“GeneSwitch™ System” (Invitrogen)]. Tale sistema di espressione inducibile comprende oltre al mifepristone (un ormone sintetico) due tipi di vettori plasmidici: il plasmide regolatore pSwitch e il plasmide d'espressione inducibile pGene/V5-His nel quale viene clonata la sequenza di interesse che si vuole fare esprimere (nel mio caso i cDNA delle varie isoforme mutate di ras) a valle di un promotore inducibile (v. Figura 4.1 nella sezione Risultati e Discussione). Il plasmide di espressione inducibile pGene/V5-His è fornito in tre versioni, cioè con un polylinker disponibile in tre reading frames (A, B e C) per facilitare il clonaggio dell'inserto in fase con una sequenza in poli-istidina. L'espressione del gene clonato in questo plasmide è sotto il controllo di un promotore ibrido che è costituito dalle UAS (upstream activating sequences) con cui interagisce il DBD (DNA binding domain) del fattore di

trascrizione GAL4 del lievito *Saccharomyces Cerevisiae*, legate alla sequenza TATA box del gene E1b di adenovirus.

Il plasmide regolatore pSwitch esprime la proteina di fusione GeneSwitch (GAL-4DBD/hPR-LBD/p65-AD) di 73 kDa che è costituita da: 1) il DBD del fattore GAL4, 2) un dominio tronco di legame (LBD) del recettore per il progesterone umano (hPR) incapace di legare gli ormoni steroidei endogeni, 3) il dominio di attivazione (AD) della subunità p65 del fattore NF-kb umano. La sequenza codificante questo fattore di trascrizione si trova sotto il controllo di un promotore ibrido che comprende 4 copie delle UAS, a cui si lega il DBS di GAL 4, legate al promotore minimo del gene per la timidina chinasi (PTK) dell'Herpes Simplex Virus; in assenza dell'induttore, cioè il mifepristone, la proteina GeneSwitch è espressa a bassi livelli a partire dal PTK ed è localizzata prevalentemente nel nucleo come forma inattiva.

Il Mifepristone è uno steroide sintetico capace di legarsi con alta affinità al dominio hPR-LBD della proteina GeneSwitch e, in questo modo, causa nella suddetta proteina un cambiamento conformazionale che porta alla sua dimerizzazione e quindi alla conversione nella sua forma attiva.

Gli omodimeri GeneSwitch complessati con il mifepristone interagiscono con le UAS di GAL4 presenti sia in pGene/V5-HisB che in pSwitch, attivando così mediante il dominio AD la trascrizione del gene clonato nel vettore d'espressione ma anche quella del gene regolatore codificante la proteina GeneSwitch; si instaura così un loop autoregolatore a feedback positivo capace di intensificare l'espressione del fattore GeneSwitch e di conseguenza attivare intensamente la trascrizione del gene di interesse. L'utilizzo del "GeneSwitch System" per lo studio delle isoforme mutate di Ras presenta, tra i numerosi vantaggi, la possibilità di valutare gli effetti di tale oncogene nel tempo e confrontarli con un clone controllo con lo stesso background genetico; la possibilità di discriminare effetti e breve e a lungo termine; la possibilità di interrompere l'induzione in un preciso momento.

Le analisi descritte in questa relazione sono state eseguite, dunque, per verificare se le differenti isoforme di Ras o mutazioni diverse di una stessa isoforma determinano risposte differenti nelle HT-29. Si è voluto inoltre verificare quali meccanismi molecolari sono in grado di attivare una risposta piuttosto che un'altra.

La caratterizzazione dei cloni ottenuti mediante l' utilizzo del sistema inducibile e le analisi preliminari quali osservazioni morfologiche e curve di crescita sono state eseguite durante una prima fase del mio progetto di dottorato svoltasi presso l'Università degli studi di Palermo.

Durante una seconda fase gli esperimenti svolti in particolare sul clone H12 e di seguito descritti, sono stati condotti presso la Sbarro Health Research Organization (S.H.R.O) della Temple University di Philadelphia (USA) presso il laboratorio del Prof. Antonio Giordano e sotto la supervisione della Prof.ssa Marcella Macaluso.

3. MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Per il mio studio sono stati utilizzati diversi cloni cellulari ottenuti a partire da cellule di adenocarcinoma coloretale della linea cellulare HT-29. Queste ultime sono cellule di aspetto epiteliale, che crescono in monostrato, aderendo al substrato il quale, nel caso delle fiasche utilizzate per gli esperimenti descritti di seguito, è costituito da polistirene. I cloni cellulari erano stati ottenuti in precedenza nel nostro laboratorio e da noi chiamati: E3; H12; K13 e K12. In particolare il clone E3 deriva dalla trasfezione di cellule HT-29 parentali con il plasmide pSwitch che codifica per un fattore di trascrizione ormone-inducibile e contenente il gene per la resistenza all'igromicina. I cloni cellulari H12, K13 e K12 invece erano stati ottenuti mediante ulteriore trasfezione in cellule E3 del plasmide pGene/V5-His B all'interno del quale erano stati clonati, rispettivamente, i cDNA delle isoforme mutate dell' oncogene Ras: H-Ras G12V: K-Ras G13D: K-Ras G12V.

Sia la linea cellulare parentale HT-29, sia i cloni da essa derivati sono stati tenuti in coltura a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ nel terreno McCoy's (Sigma) reso completo mediante l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) al 10%, glutammina 2mM, antibatterici (penicillina 5 U/ml e streptomina 5 µg/ml) e antimicotici (Anfotericina B 25 µg/ml). Il terreno così preparato viene indicato come "terreno completo". Per mantenere la selezione del plasmide pSwitch nel clone cellulare E3 è stato aggiunto al terreno completo l'antibiotico Igromicina alla concentrazione di 400µg/ml (Invitrogen). Per i cloni cellulari H12; K13 e K12 è stata necessaria l'aggiunta al terreno completo di Igromicina alla concentrazione di 400µg/ml, ma anche dell'antibiotico Zeocina alla concentrazione di 100 µg/ml per il mantenimento della selezione del plasmide pGene/V5-His B.

Per ottenere, nei cloni trasfettati con i plasmidi pSwitch e pGene/V5-His B, l'induzione dell'espressione delle diverse isoforme mutate dell' oncogene Ras è stato aggiunto al terreno completo contenente antibiotici anche l'ormone Mifepristone alla concentrazione di 10⁻⁸M.

Trypsinizzazione e allargamento delle colture cellulari

Allontanato il terreno, la cui presenza inibirebbe l'azione della tripsina, sono stati eseguiti due lavaggi con PBS (Phosphate buffer solution, Euroclone) in modo da eliminare ogni residuo di terreno.

Successivamente è stata aggiunta l'opportuna quantità di una soluzione contenente Trypsina 0,05% ed EDTA 1mM. La tripsina è un enzima proteolitico che degrada le proteine di membrana implicate nelle adesioni cellula-cellula e cellula-substrato. L'EDTA (acido etilendiamminotetracetico) è, invece, un agente chelante, cioè un agente in grado di sequestrare i cationi bivalenti, necessari per stabilizzare le adesioni cellula-cellula e cellula-substrato.

La miscela Trypsina-EDTA è stata fatta agire per 2-3 minuti a 37 °C. Una volta che le cellule si siano staccate, è stata aggiunta un'opportuna quantità di terreno completo, necessario a inibire l'azione della tripsina che, altrimenti, potrebbe degradare proteine importanti per lo svolgimento delle funzioni cellulari. Un'aliquota di tale sospensione cellulare è stata trasferita in una nuova fiasca, contenente il terreno fresco, posta poi nuovamente nell'incubatore.

Congelamento cellulare

Prima di procedere con il congelamento, le cellule sono state trypsinizzate, risospese in terreno completo e contate tramite la camera di Thoma. Le cellule sono state, quindi, trasferite in provette da 10 ml e centrifugate per 5 minuti a 1000 rpm (centrifuga da banco ALC 4232), velocità che consente la sedimentazione delle cellule senza che quest'ultime si rompano. Dopo avere aspirato il terreno, il pellet è stato risospeso, in modo da avere circa 4 milioni di cellule per ml, in una soluzione di DMSO (DimetilSolfossido) al 10% in siero e, in seguito, questa soluzione è stata aliquotata in criotubi da 1 ml. Infine, i criotubi, dopo essere stati tenuti per 24 ore a -80 °C, sono stati conservati in azoto liquido, ad una temperatura di -180 °C.

Scongelamento di cellule conservate in Azoto liquido

I criotubi contenenti le cellule sono stati prelevati dall'azoto liquido, tenuti per 1 minuto a temperatura ambiente e poi 1-2 minuti a 37 °C.

Prima del congelamento, alle cellule era stato aggiunto DMSO (DimetilSolfossido), agente criopreservante, che deve essere eliminato dopo lo scongelamento. Le cellule del criotubo, dopo avere aggiunto 0,5 ml di terreno McCoy's, sono state trasferite in una provetta da 10 ml, nella quale, precedentemente, erano stati messi 8 ml di terreno. La sospensione cellulare è stata, quindi, centrifugata per 5 minuti a 1000 rpm (centrifuga da banco ALC 4232). Aspirato il supernatante, il pellet è stato risospeso in 7 ml di terreno. La sospensione è stata, infine, trasferita in una fiasca da 25 cm².

Dopo 24 ore il terreno delle fiasche è stato sostituito con terreno fresco, eliminando così le cellule che non erano sopravvissute al processo di congelamento/scongelamento e che quindi, non potendo aderire al substrato, erano rimaste in sospensione.

Saggi di proliferazione mediante conta cellulare

Sui cloni selezionati sono stati eseguiti dei saggi di proliferazione, al fine di valutare eventuali effetti determinati dall'induzione dell'espressione dell'isoforma mutata di Ras sul tasso di crescita cellulare. A tale scopo sono state allestite, per ciascun clone cellulare, piastre da sei pozzetti ciascuna. Le cellule in alcune di tali piastre sono state sottoposte a trattamento con ormone mentre quelle nelle altre non hanno subito tale trattamento e sono state utilizzate come controllo. Per eseguire tali saggi di proliferazione sono state piastrate per ciascun clone 200.000 cellule in ogni pozzetto.

Ventiquattro ore dopo la piastratura, le cellule di due pozzetti per ciascun campione sono state staccate dal substrato mediante trattamento con tripsina-EDTA, risospese nell'opportuna quantità di terreno McCoy's e contate mediante camera di Thoma. Tale conta a tempo zero consente di determinare eventuali variazioni tra campione controllo e trattato dovute a differenze nel numero di cellule piastrato inizialmente. In seguito a questa prima conta, alle cellule da trattare viene

aggiunto il Mifepristone alla concentrazione di 10^{-8}M , rivelatasi la concentrazione ottimale in seguito a saggi precedenti eseguiti nel nostro laboratorio.

A intervalli di 24h, sono state dunque contate, secondo le modalità precedentemente descritte, le cellule di due pozzetti per ciascun campione finchè le cellule non raggiungono la confluenza.

I valori medi delle conte cellulari effettuate, con le rispettive deviazioni standard, sono stati utilizzati per disegnare delle curve di crescita.

Saggi di proliferazione mediante XTT

I saggi di proliferazione sono stati effettuati utilizzando il Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche). Il sale di tetrazolio XTT viene convertito dalle deidrogenasi mitocondriali in un composto arancione, il formazano, solubile e quantificabile spettrofotometricamente. Un incremento nel numero di cellule vitali corrisponde ad un incremento dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali e a tale incremento corrisponde un aumento della quantità di formazano.

Secondo protocollo, 5000 cellule per ciascun pozzetto sono state piastrate in una piastra 96-well in 100µl di terreno. Il giorno seguente è stata preparata una soluzione di colorazione XTT aggiungendo, per ogni pozzetto, a 50µl di reagente XTT 1µl di reagente di accoppiamento elettronico. 50µl di questa soluzione sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e le cellule incubate a 37 °C per 4 ore. I campioni sono stati quindi analizzati mediante un luminometro "2030 Multilabel Reader" (PerkinElmer).

Estrazione dell' RNA totale

L'RNA totale delle cellule utilizzate per le analisi da me effettuate è stato estratto seguendo il metodo ideato da Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). A tale protocollo sono state apportate delle modifiche nel nostro laboratorio.

L'estrazione è stata effettuata a partire da 108 milioni di cellule per ciascun campione. Le cellule, dopo essere state tripsinizzate, vengono risospese in 8 ml di terreno, trasferite in una provetta da 10 ml e centrifugate a circa 1000 rpm (centrifuga da banco ALC 4232) per 5 minuti. I pellets cellulari dopo essere stati sciacquati mediante risospensione in PBS, trasferiti in tubi corex e centrifugati nuovamente a circa 1000 rpm per 5 minuti, sono stati lisati per aggiunta di 1,5 ml di un tampone contenente, in 50ml di volume finale, 25gr di guanidinio-isotiocianato, 5 ml di Sodio-citrato 420mM, 5 ml di Sarcosile 8,3%, 375 μ l di β -mercaptoetanololo (c.f 0,1M).

Al lisato sono stati aggiunti poi 1/10 di volume di Na acetato 2M a pH 4 e, successivamente, un volume di Fenolo acido. Dopo avere aggiunto anche un volume di cloroformio, avere agitato in vortex e avere lasciato i campioni per 30 minuti in ghiaccio, le soluzioni sono state centrifugate a 23700 g per 10 minuti a 4 °C.

È stata prelevata, quindi, la fase acquosa (contenente l'RNA), prestando attenzione a non prelevare anche l'interfase. È stato aggiunto poi un volume di isopropanolo e, dopo avere incubato il campione a -20 °C per almeno 3 ore, si è centrifugato a 12000 g per 5 minuti a 4°C. A questo punto è stato eliminato il supernatante e, dopo avere effettuato una seconda centrifugazione (12000 g per 5 minuti a 4 °C) ed avere eliminato l'isopropanolo residuo, si è risospeso il pellet in 2 ml del tampone contenente guanidinio-isotiocianato (v. sopra) ed è stato aggiunto un altro volume di isopropanolo.

Il campione è stato poi lasciato a -20 °C per 1 ora, passata la quale è stata effettuata un'ulteriore centrifugazione (12000 g per 15 minuti a 4 °C). Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 1 ml di EDTA 1mM a pH 7 e, dopo avere aggiunto un volume di Cloroformio, agitato in vortex e centrifugato (1500 g per 5 minuti), è stata prelevata la fase acquosa, alla quale sono stati aggiunti

½ volume di Ammonio acetato 7,5 M e 2,5 volumi di etanolo. Dopo aver lasciato il campione per alcune ore a -20 °C è stata eseguita una prima centrifugazione a 7700 g per 15 minuti a 4 °C, è stato eliminato il supernatante ed è stata eseguita una seconda centrifugazione a 6000 g per 5 minuti. Infine, eliminato l'etanolo residuo, il pellet è stato risospeso in 100µl di EDTA 1mM a pH 7.

A questo punto è stato effettuato un trattamento con DNasi aggiungendo: 1µl di MgCl₂ 1M; 2µl di Na acetato 3M a pH 5; 1µl di DNasi RNasi-free (10U/µl, Roche) e incubando per 30 minuti a 37 °C.

Sono stati aggiunti, quindi, 3µl di EDTA 0,5 M a pH 7 e si è eseguita un'estrazione dell'RNA con fenolo/cloroformio (1volume/1volume) e poi con cloroformio (1 volume). Alla fase acquosa sono stati aggiunti ½ volume di Ammonio acetato 7,5 M e 2,5 volumi di etanolo.

L'RNA così precipitato è stato posto a -20°C per una notte, ed è stato poi centrifugato a 10000 rpm per 30 minuti. Allontanato il supernatante, il pellet è stato, infine, risospeso in 100 µl di EDTA 1mM pH7.

Un'aliquota dell'RNA estratto è stata utilizzata, dopo averne determinato la concentrazione mediante spettrofotometro, per eseguire una verifica d'integrità su gel d'agarosio, come descritto in seguito. Alcune aliquote sono state poste a -80°C e altre sono state riprecipitate con ½ volume di Ammonio acetato 7,5 M e 2,5 volumi di etanolo e conservate a -20°C.

Tutto il materiale utilizzato era stato precedentemente reso RNasi -free per trattamento in autoclave o in stufa a 180°C over-night.

Estrazione del DNA genomico

Il DNA Genomico utilizzato nelle analisi da me effettuate è stato estratto utilizzando il “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega). Le cellule sono state fatte crescere in fiasche da 75 cm² e, dopo essere state tripsinizzate e raccolte, sono state lavate con PBS per eliminare residui di terreno. Le cellule sono state quindi nuovamente raccolte e lisate utilizzando una Nuclei Lysis Solution fornita dal kit. Dopo essere state risospese nella soluzione di lisi sono stati aggiunti 3 µl di RNasi ed è stata eseguita un'incubazione di 30 min a 37 °C. Al lisato è stata quindi aggiunta

una Protein Precipitation Solution fornita dal kit e dopo un'incubazione di 5 min in ghiaccio il campione è stato centrifugato per 4 min a 15000 g. Dopo centrifugazione il supernatante contenente il DNA è stato prelevato e trasferito in un micro tubo da centrifuga contenente 600 µl di isopropanolo; dopo avere mescolato la soluzione così ottenuta per inversione e avere centrifugato per 1 min a 15000 g, il pellet così formatosi è stato risospeso in 600 µl di etanolo 70%. In seguito ad ulteriore centrifugazione di 1 min a 15000 g, una volta aspirato il supernatante, il pellet è stato lasciato ad asciugare all' aria per permettere l' evaporazione dell' etanolo residuo ed è stato infine risospeso in 50 µl di DNA Rehydration Solution fornita dal kit.

RT- PCR

Le reazioni di restrotrascrizione di seguito descritte sono state eseguite preparando, per ogni campione, una soluzione contenente: 1µl di dNTPs 10mM, 1µg di RNA totale, 2µl di “random 9mers” 5µM, acqua per portare il volume finale a 13µl. A tale soluzione, dopo un'incubazione a 65 °C per 5 minuti, sono stati aggiunti 4µl dell'opportuno buffer 5X e 2µl di DDT 0,1 M. Dopo un'ulteriore incubazione a 42 °C per 2 minuti, è stato aggiunto 1µl di SuperScript II Reverse Transcriptase (200U/µl, Invitrogen) e si è incubato a 42 °C per 50 minuti e, successivamente, a 70 °C per 15 minuti così da inattivare l'enzima.

Un'aliquota del campione è stata poi utilizzata come stampo per la reazione di amplificazione. La PCR è stata eseguita utilizzando coppie di primers disegnati utilizzando l'interfaccia Primer3 Web; tali primers sono elencati nella tabella seguente:

Primer name	Forward primer	Reverse primer
HRas	cgcgtgtttgacctccatag	ccttcacccgtttgatctg
R4	gctgttttgacctccatagaagac	tctgggaatactggcacttagag
His	ctgctattctgctcaacct	tagaaggcacagtcgagg

È stata preparata una soluzione contenente: 2µl della miscela di reazione di retrotrascrizione; 5µl dell'opportuno buffer 10X; 1µl di dNTPs 10mM; 2µl di primers (forward and reverse, 5µm);

0,5µl di Taq polimerasi (5U/µl, Euroclone); 1,5µl di MgCl₂ 50mM; 36µl di acqua per portare il volume finale a 50µl.

La reazione è stata, quindi, condotta in un termociclatore “iCycler” (BIORAD) eseguendo, se non altrimenti descritto nel testo, un ciclo di 2 minuti a 95°C, 35 cicli di:

- 45 secondi a 95°C
- 45 secondi a 59°C
- 60 secondi a 72°C

e infine 10 minuti a 72°C.

L'esito della reazione è stato verificato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1,2% di un'aliquota di ciascun campione.

Real Time PCR

Le reazioni di Real Time PCR sono stati eseguite utilizzando la Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). In particolare per ogni campione è stata preparata una mix contenente: 2 µl di cDNA (ottenuto come precedentemente descritto); 1 µl di primer F (5µM); 1 µl di primer R (5µM); 12,5 µl di Power SYBR Green PCR Master Mix; 8,5 µl di acqua per portare ad un volume finale di 25 µl. Le reazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore “7300 Real Time PCR System” (Applied Biosystems) e i dati sono stati analizzati utilizzando il programma ad esso associato. Per ogni campione, poi, la quantità degli amplificati è stata normalizzata contro quella della β-actina, scelta come controllo interno e i dati così ottenuti sono stati indicati come incremento rispetto ai livelli di espressione osservati nei singoli controlli.

Primer name	Forward primer	Reverse primer
p21	atgaaattcacccttcc	aggtgaggggactccaaagt
β-actin	gatgagattggcatggcttt	caccttcaccgtccagttt

Analisi FACS

Dopo essere state tripsinizzate e centrifugate a 350 g per 5 minuti le cellule sono state lavate in PBS e ricentrifugate. Nel caso dello staining con solo Propidio Ioduro i pellet così ottenuti sono stati risospesi in 0,5 ml di PBS e fissati mediante aggiunta di 5 ml di Etanolo 70%. Le cellule fissate sono quindi state centrifugate a 350 g per 5 minuti e, dopo avere eseguito due lavaggi con PBS, sono state trattate con una soluzione contenente Propidio Ioduro 1mg/ml e Rnasi A 1mg/ml in PBS. Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37 °C i campioni sono stati processati mediante uno strumento BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Nel caso della doppia marcatura con Propidio Ioduro e Annexin V e' stato utilizzato il "Annexin V-FITC Apoptosis Kit" (BioVision). I pellet sono stati risospesi nel binding buffer e sono stati aggiunti 5 µl di Annexin V e 5 µl di Propidio Ioduro (entrambi forniti dal kit). Dopo un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente i campioni sono stati immediatamente processati mediante uno strumento BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). I dati sono stati dunque analizzati mediante il software WinMDI.

Western Immunoblotting

Per preparare i lisati proteici le cellule sono state lisate utilizzando un tampone contenente Tris-HCl 50mM pH7,4, EDTA 5 mM, NaCl 250mM, Triton X-100 0,1%. Dopo averli incubati per 30 minuti in ghiaccio i lisati sono stati centrifugati a 13000 g per 5 minuti ed e' stato prelevato il supernatante contenente le proteine. Gli estratti proteici sono stati quantificati mediante biofotometro utilizzando la colorazione Bradford (Biorad). Uguali quantità di estratto proteico sono state caricate e risolte su gel di SDS-poliacrilammide sia al 10 che 15% per 2 ore a 100 volts e quindi trasferite su membrana di nitrocellulosa (Whatman) per 1 ora e 30 minuti a 70 volts. Le membrane sono quindi state bloccate utilizzando PBS/Milk 3% e incubate con i rispettivi anticorpi a 4 °C over night, successivamente sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS-Tween 20 0,1% e infine le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con

l'anticorpo secondario coniugato con HRP (Perossidasi di Rafano) e sviluppate utilizzando il Western lightning detection kit (PerkinElmer).

Gli anticorpi utilizzati per queste analisi sono stati acquistati dalla “Santa Cruz Biotechnology”.

Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

L'immunoprecipitazione della Cromatina è un metodo ampiamente usato per studiare ed identificare specifiche interazioni tra proteine, ad esempio fattori di trascrizione, e porzioni di DNA genomico quali, ad esempio, promotori ed enhancers.

Per questa analisi, cellule H12, raggiunta una confluenza di circa l'80%, sono state fissate per 10 minuti mediante aggiunta al terreno di coltura di formaldeide ad una concentrazione finale dell'1% e, poi, incubate per 5 minuti con Glicina 0,125 M per bloccare la reazione di cross-linking; sono state quindi raccolte, lisate e la cromatina è stata frammentata mediante digestione enzimatica per 10 minuti utilizzando la miscela enzimatica fornita dalla ditta (ChIP-IT kit, Active Motif).

Dopo aver verificato le dimensioni dei frammenti di cromatina ottenuti, è stato eseguito il saggio ChIP seguendo il protocollo descritto nel manuale. I frammenti immunoprecipitati sono stati successivamente amplificati mediante PCR utilizzando coppie di primers disegnate sul promotore prossimale di p21.

Gli anticorpi utilizzati per questa analisi sono stati acquistati dalla “Active Motif”.

Primer name	Forward Primer	Reverse Primer
p21 chip 2	CCCGGAAGCATGTGACAATC	CAGCACTGTTAGAATGAGCC
p21 chip 3	GGAGGCAAAAGTCCTGTGTTC	GGAAGGAGGGAATTGGAGAG
p21 chip 4	CTCTCCAATTCCTCCTTCC	AGAAGCACCTGGAGCACCTA
p21 chip 5	TAAATCCTTGCTGCCAGAG	GGTGCGCTGGACACATT

Saggio caspasico

I saggi caspasici sono stati effettuati utilizzando il kit Homogenous Caspases Assay (Roche). Quest'ultimo consiste in un saggio per la determinazione quantitativa *in vitro* dell'attività caspasica. Le cellule apoptotiche sono incubate con la DEVD-rodamina 110 per 24 ore. In seguito al taglio del substrato da parte delle caspasi attivate, viene misurata la fluorescenza della Rodamina 110 libera.

Secondo protocollo, 5000 cellule per ciascun pozzetto sono state piastrate in una piastra 96-well in 50µl di terreno e trattate (v. Risultati). Il giorno seguente è stata aggiunta una Working Solution fornita dal kit e le cellule sono state incubate per 24 ore a 37 °C. I campioni sono stati quindi analizzati mediante un luminometro "2030 Multilabel Reader" (PerkinElmer).

Immunofluorescenza

Per eseguire i saggi di immunofluorescenza le cellule sono state piastrate su particolari supporti, le "chamber slides" (NUNC), costituite da una camera in plastica divisa in 4 pozzetti incollata su un vetrino. Una volta raggiunta la confluenza dell' 80%, dopo avere eliminato il terreno, sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS della durata di 5 minuti ciascuno e le cellule sono state fissate con una soluzione di Paraformaldeide (PFA) al 4% e lasciate a incubare a temperatura ambiente per 20 minuti. Eliminata la PFA, dopo avere eseguito 3 lavaggi, è stata effettuata la permeabilizzazione mediante utilizzo di una soluzione di PBS-Triton X-100 0,1% e le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono stati, dunque, effettuati altri 3 lavaggi e, dopo avere eseguito il blocking in PBS/BSA 5% per un ora a temperatura ambiente, le cellule sono state incubate over-night a 4 °C con l'anticorpo primario. Il giorno successivo, dopo 3 lavaggi in PBS, è stata effettuata un' incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con un fluorocromo. Dopo avere incubato anche con il DAPI per un minuto i vetrini sono stati analizzati mediante microscopio a fluorescenza.

Gli anticorpi utilizzati per questa analisi sono stati acquistati dalla "BD Bioscience".

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il primo scopo della ricerca condotta durante questo progetto di dottorato e' consistito nella caratterizzazione dei cloni contenenti le diverse isoforme mutate di Ras e nella verifica della riproducibilità del sistema "GeneSwitch"(Fig. 4.1).

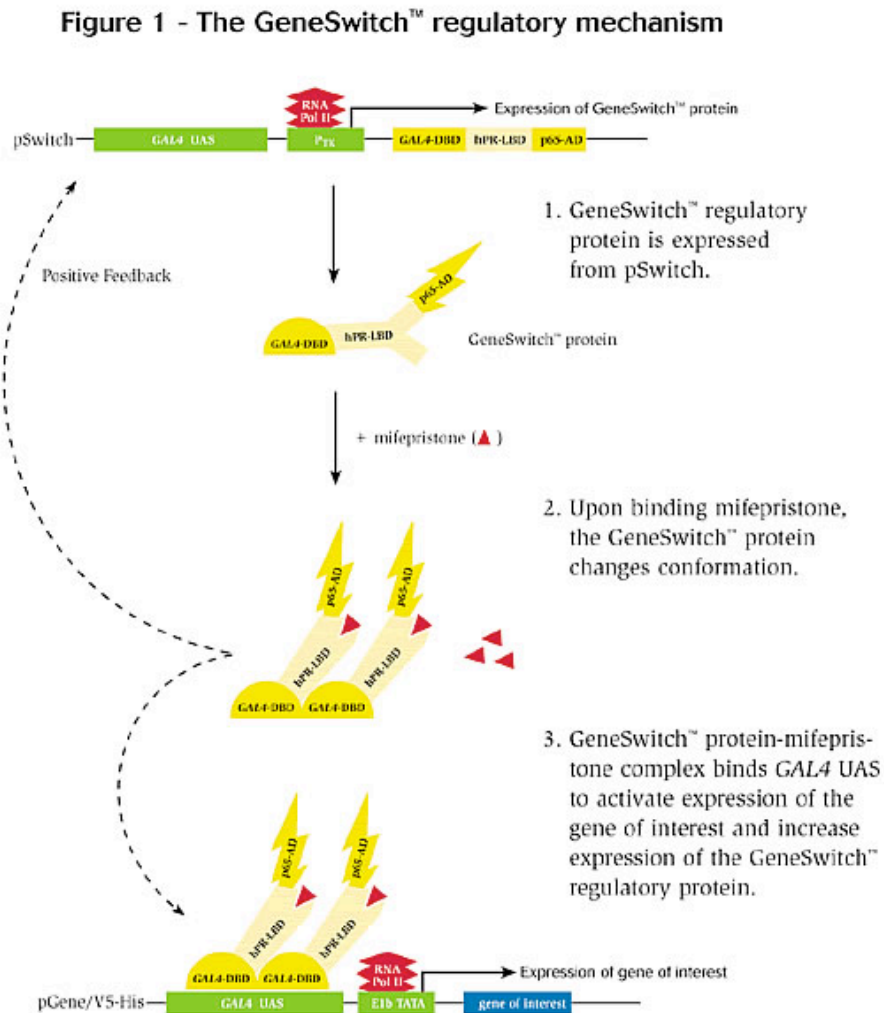


Figura 4.1. Rappresentazione schematica del meccanismo di azione del sistema Gene Switch

Le analisi, in particolare saggi di proliferazione e osservazioni morfologiche, sono state eseguite su cloni precedentemente ottenuti nel laboratorio dove ho svolto l'attività di ricerca e in particolare su cellule HT-29 non trasfettate; trasfettate con H-RASG12V (indicate come H12); K-

RASG12V (indicate come K12); K-RASG13D (indicate come K13) rispettivamente trattate con Mifepristone (M) e non trattate (C).

In figura 4.2 sono mostrati i risultati dei saggi di proliferazione eseguiti sui diversi cloni e sulle cellule parentali. Il trattamento con Mifepristone non produce alcun effetto sulle cellule parentali e tutti i cloni, in assenza di induzione, esibiscono un tasso proliferativo paragonabile a quello delle HT-29. Appare inoltre evidente come l'induzione dell'espressione di isoforme diverse di Ras produce effetti profondamente diversi nello stesso sistema cellulare. Al contrario del clone K12 in cui l'espressione di K-RASG12V non sembra avere alcun effetto, i cloni H12 e K13 subiscono già dopo 24 ore un rallentamento del ritmo proliferativo, che si mantiene pressoché costante negli intervalli di tempo successivi nel caso del clone K13 ma subisce un ulteriore calo nel caso del clone H12.

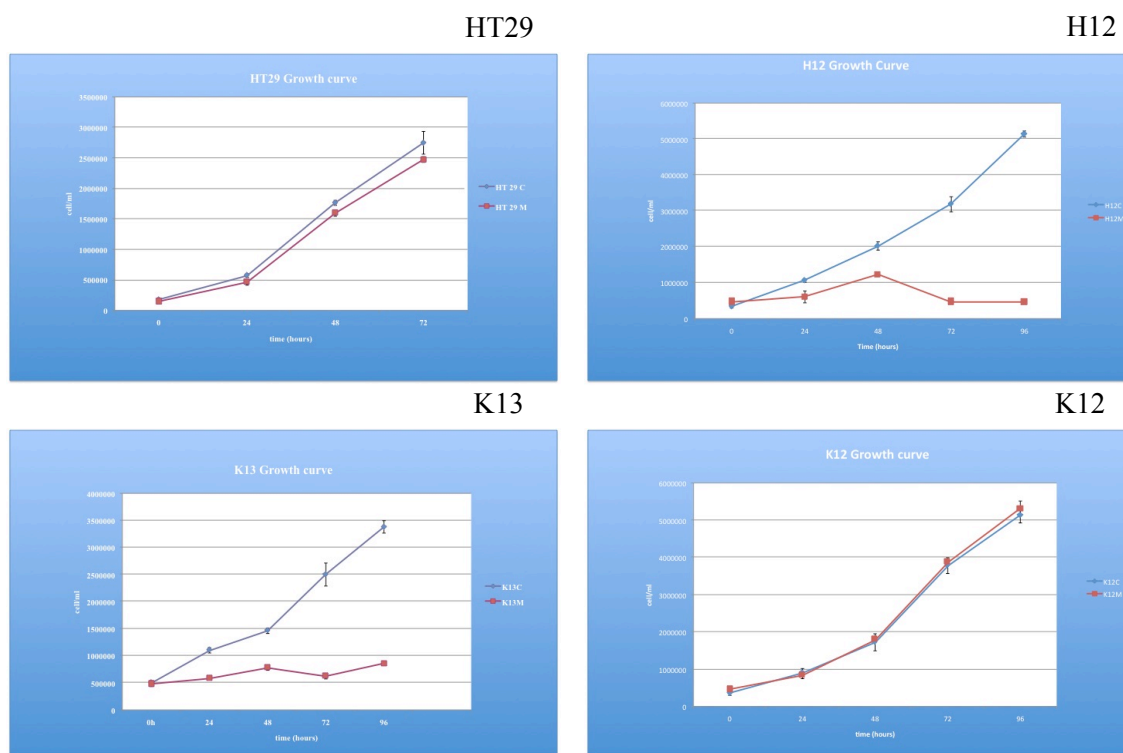
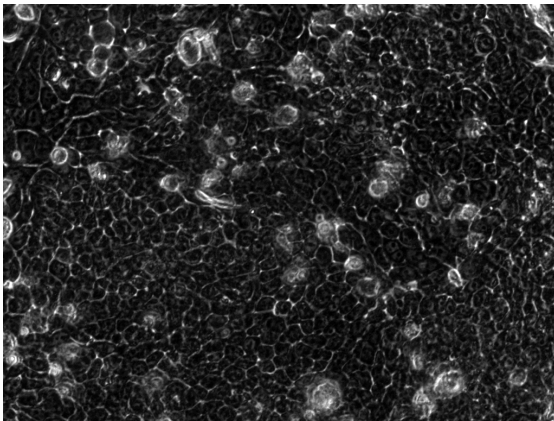


Figura 4.2. Saggi di proliferazione eseguiti sulle cellule parentali HT-29 e sui cloni H12, K13, K12 trattati con Mifepristone (M), rappresentati in rosso, e non trattati (C), rappresentati in blu. Sull'asse delle ordinate è indicato il numero di cellule per ml. Sull'asse delle ascisse la durata del trattamento ad intervalli di 24 ore. La deviazione standard è stata calcolata sulla base di tre esperimenti indipendenti ciascuno dei quali condotto in duplicato.

Inoltre in seguito all'induzione dell'isoforma HRasG12V già dopo 24 ore sono stati osservati cambiamenti morfologici evidenti; le cellule infatti sembrano ingrandite e cominciano ad apparire come singole piuttosto che come gruppi. Dopo 48 ore questo effetto risulta ancora più accentuato, come mostrato in figura 4.3, e si notano diverse cellule in sospensione nel terreno di colture. Questo fenotipo persiste anche dopo giorni dall'induzione, suggerendo che l'espressione di HRasG12V possa essere in grado di indurre qualche forma di morte cellulare.

H12 C



H12 M

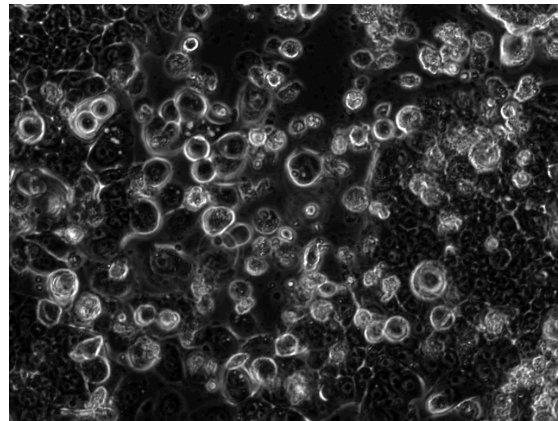
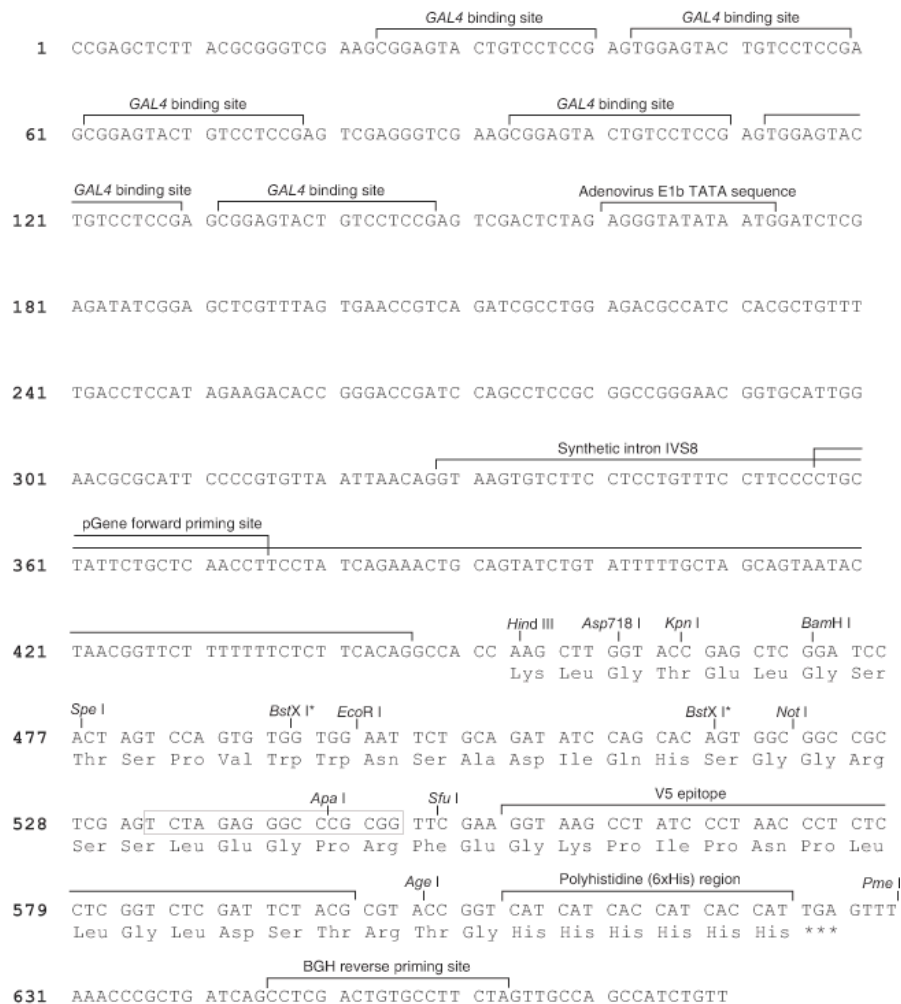


Figura 4.3. A sinistra cellule H12 non trattate. A destra cellule H12 dopo 48 ore di trattamento con Mifepristone. Le cellule sono state visualizzate mediante microscopio ottico con ingrandimento 20X e quindi fotografate.

Per verificare se gli effetti profondamente diversi provocati dalle tre isoforme mutate di RAS dipendessero dall'isoforma in se, o solo dal sito di inserzione nel DNA genomico dei plasmidi contenenti i loro cDNA, ho eseguito lo stesso tipo di analisi su cloni di HT-29 diversi da quelli presi in considerazione in precedenza, trasfettati con H-RASG12V (indicate come H5) e con K-RASG13D (indicate come K7). In questi ultimi cloni isolati in passato contemporaneamente ai cloni H12 e K13 non era mai stata verificata ne' l'integrazione dei plasmidi del "GeneSwitch™ System" nel genoma ne' l'espressione del messaggero delle isoforme mutate di Ras in seguito ad induzione. Dopo avere estratto il DNA genomico da entrambi i cloni utilizzando il "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (v. Materiali e Metodi) e dopo averne verificato l'integrità, 0,5µg di ciascun DNA genomico è stato utilizzato come stampo per eseguire delle PCR per verificare l'effettiva integrazione del plasmide d'espressione inducibile contenente

rispettivamente le isoforme H-RASG12V e K-RASG13D. Tali PCR sono state eseguite come schematizzato nella figura 4.4a e cioè utilizzando i primers His F e His R (v. Materiali e Metodi), complementari a regioni del plasmide pGene/V5-HisB poste a monte e a valle del cDNA in esso clonato e i primers R4 F e R4 R e HRas F e HRas R i quali amplificano rispettivamente l' isoforma K-RASG13D e l' isoforma H-RASG12V poiché i primers reverse di ciascuna coppia si appaiano sul cDNA a sequenze a valle del codone di stop. I primers forward di ciascuna coppia, invece, si appaiano a sequenze del DNA plasmidico poste a monte dell' introne sintetico "IVS8" e ciò consente di amplificare i cDNA delle isoforme mutate, discriminandoli dalle sequenze wild-type presenti nel genoma delle HT-29 (v. Box 4.1).



Box 4.1.
Rappresentazione schematica dell' MCS del vettore pHisB. All' interno di questa regione cadono i primers HisF (posizione 357-375), HisR (posizione 646-663), HRasF (posizione 233-252) e R4F (posizione 234-257).

Dall'analisi della figura 4.4b, relativa al clone H5, si evince che sia i primers His F e His R sia i primers HRas F e HRas R hanno dato un amplificato delle dimensioni attese, di 1200 bp e 600 bp rispettivamente. Lo stesso tipo di analisi per PCR è stata eseguita anche sul DNA genomico del clone K7. Il risultato di questa amplificazione è mostrato in Fig. 4.4c dove i prodotti sono delle dimensioni attese cioè 1100bp per l'amplificato di R4 F e R4 R e 1300bp per l'amplificato di His F e His R. Possiamo dunque concludere che sia il clone H5 che il clone K7 presentano integrato nel loro genoma il plasmide contenente l'isoforma mutata H-RASG12V e KRASG13D rispettivamente.

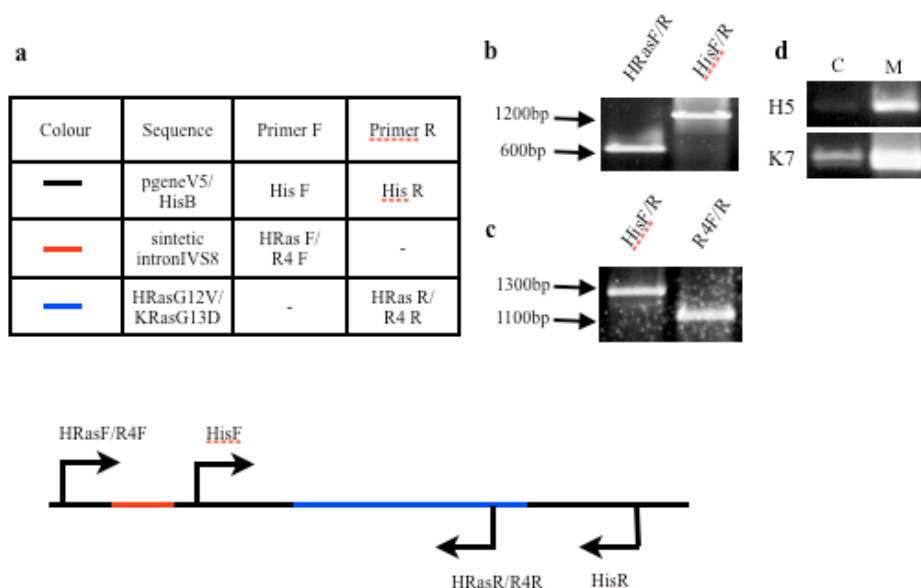


Figura 4.4a. Rappresentazione schematica della disposizione delle coppie di primers utilizzate per le amplificazioni mediante PCR. **4.4b** Pattern elettroforetico dei prodotti di PCR eseguita su 0,5µg di DNA genomico estratto da cellule H5 utilizzando i primers HRasF e HRasR e HisF e HisR. **4.4c** Pattern elettroforetico dei prodotti di PCR eseguita su 0,5µg di DNA genomico estratto da cellule K7 utilizzando i primers HisF e HisR e R4F e R4R. **4.4d** Pattern elettroforetico dei prodotti delle reazioni di RT-PCR eseguite sugli RNA dei cloni H5 e K7 trattati con Mifepristone (M) e non trattati (C).

Una volta verificata l'integrazione del plasmide in entrambi i cloni, è stato necessario verificare l'espressione del messaggero delle isoforme mutate di Ras in seguito al trattamento con Mifepristone.

Cellule di ciascun clone sono state piastrate in fiasche da 75cm² e trattate con Mifepristone così da attivare l'espressione dell'isoforma mutata di Ras. Dopo 48h di trattamento le cellule sono state tripsinizzate, raccolte e lisate mediante aggiunta di Guanidinio Isotiocianato e β -mercaptoetanolo; allo stesso modo, per ciascun clone, sono state preparate e lisate cellule non sottoposte a trattamento con ormone che sono state utilizzate come controllo. A partire da questi campioni è stata eseguita l'estrazione dell'RNA come descritto in Materiali e metodi e, dopo averne verificato l'integrità e averlo quantificato, 1 μ g di RNA per ciascun campione è stato utilizzato come stampo in una reazione di retrotrascrizione eseguita al fine di verificare l'espressione delle isoforme oncogene di Ras in seguito all'induzione con Mifepristone. Tale reazione è stata effettuata utilizzando, secondo il clone utilizzato, il primer specifico per il cDNA di H- o K-Ras (H-Ras R e R4 R rispettivamente). Al termine della reazione di retrotrascrizione, 2 μ l di cDNA così ottenuto sono stati utilizzati come stampo per una successiva reazione di PCR eseguita con le coppie di primers R4 F e R4 R per K7 e Hras F e Hras R per H5. In figura 4.4d sono mostrati i risultati della verifica eseguita su gel d'agarosio 1,2%. Per quanto riguarda i campioni H5C e H5M il cDNA trasfettato presenta un minimo livello di espressione basale anche in assenza di induzione. Il clone K7 esprime anch'esso il cDNA trasfettato in seguito al trattamento con Mifepristone ma presenta una discreta espressione basale anche in assenza di induzione. Sono stati verificati anche i livelli di β -actina, scelta come controllo interno) che non presenta alcuna differenza tra i campioni trattati e non (dati non mostrati).

Dopo avere verificato che i due nuovi cloni di HT-29 contengono ed esprimono in seguito ad induzione le isoforme mutate di Ras, sono stati eseguiti saggi di proliferazione ed osservazioni morfologiche al fine di valutare se ci fosse o meno variazione clonale, cioè valutare se i cambiamenti fenotipici e nel tasso proliferativo già osservati sui cloni H12 (H-RASG12V) e K13 (K-RASG13D), fossero riscontrabili anche nei cloni H5 (H-RASG12V) e K7 (K-RASG13D).

Dall'esame della figura 4.5 si nota che il trattamento con Mifepristone del clone H5 provoca, dopo 48h, una drammatica caduta del tasso proliferativo, significativi cambiamenti morfologici (le cellule appaiono ingrandite e isolate le une dalle altre) e un'elevata frequenza di morte cellulare. L'induzione dell'espressione di RAS nel clone K7 invece ne fa rallentare dopo 48h l'attività proliferativa senza però dare origine a morte cellulare.

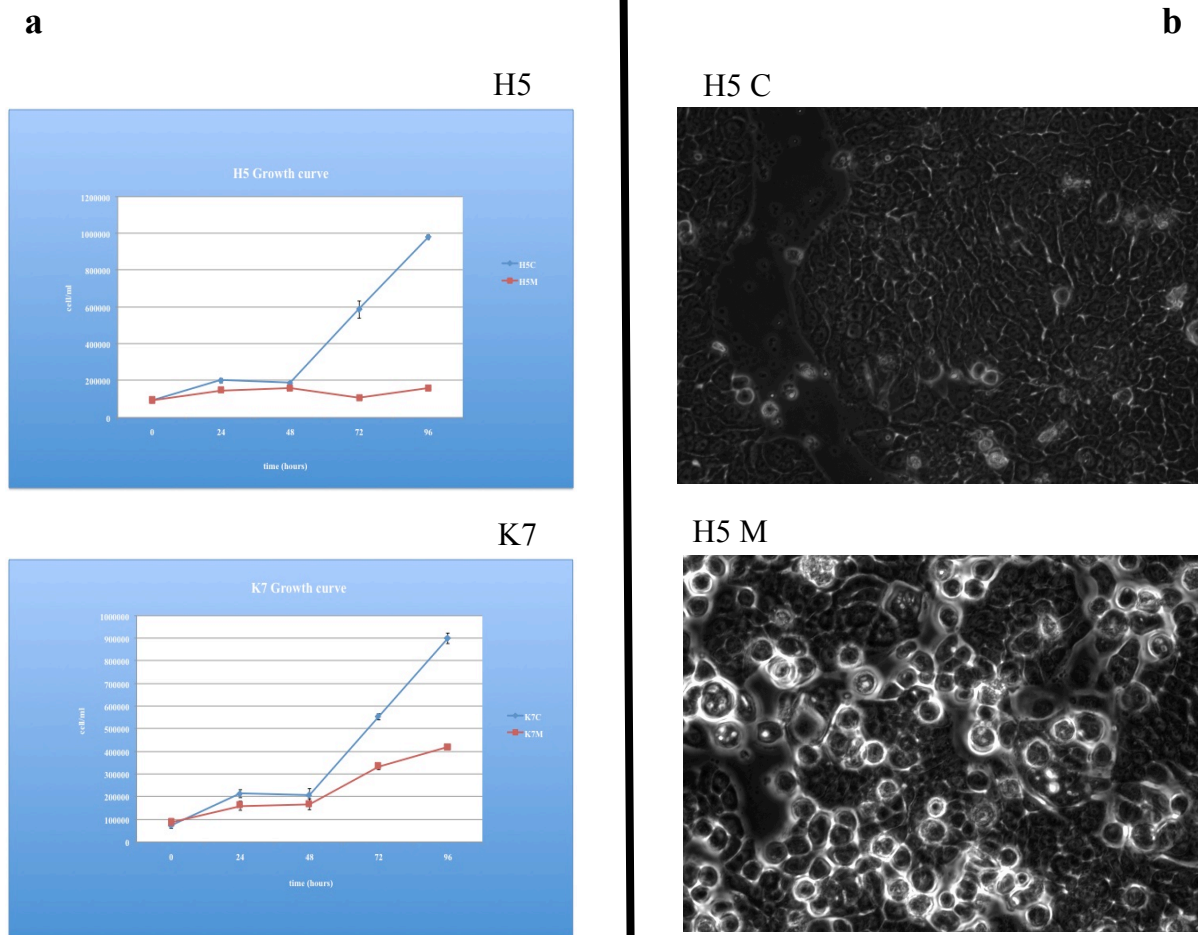


Figura 4.5a. Saggi di proliferazione eseguiti sui cloni H5 e K7 trattati con Mifepristone (M), rappresentati in rosso, e non trattati (C), rappresentati in blu. Sull'asse delle ordinate è indicato il numero di cellule per ml. Sull'asse delle ascisse la durata del trattamento ad intervalli di 24 ore. La deviazione standard è stata calcolata sulla base di tre esperimenti indipendenti. **4.5b.** In alto cellule H5 non trattate. In basso cellule H5 dopo 48 ore di trattamento con Mifepristone. Le cellule sono

Caratteristiche simili erano state riscontrate in precedenza su cellule H12 e K13 le quali si comportavano in modo analogo (v. Fig. 4.3). È possibile pertanto concludere che gli effetti osservati non sono dovuti al punto di inserzione del plasmide nel genoma delle cellule o alla variabilità genetica delle cellule in coltura stesse ma che tali effetti sono dovuti in maniera specifica all'espressione delle diverse isoforme oncogene di Ras.

Alla luce di quanto fino a qui descritto, le tre diverse isoforme mutate di Ras determinano effetti profondamente diversi nelle HT-29 sia dal punto di vista proliferativo che morfologico. Tuttavia, il cambiamento più evidente è stato riscontrato in seguito all'espressione di HRASG12V e pertanto nel corso del mio progetto di dottorato ho approfondito le analisi sul clone H12.

Al fine di caratterizzare ulteriormente le alterazioni nel ciclo cellulare del clone H12 in seguito all'induzione dell'espressione dell'isoforma mutata di Ras, sono state eseguite analisi FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) a diversi tempi di trattamento con Mifepristone.

Dopo essere state raccolte e fissate mediante aggiunta di Etanolo 70%, le cellule sono state lavate con PBS e trattate con una soluzione contenente Propidio Ioduro (1mg/ml) e Rnasi A (1mg/ml). I campioni sono stati incubati a 37 °C per 30 minuti e quindi analizzati mediante un "BD FACSCalibur" (BD Biosciences, San Jose, CA).

I risultati ottenuti sono mostrati in figura 4.6 dove sono mostrati i picchi di fluorescenza del Propidio Ioduro e in figura 4.7 nella quale è riportato un grafico dei valori in percentuale delle cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

È possibile notare che il clone H12 non trattato presenta un picco G1/S ben distinto e solo una certa percentuale di cellule in fase S e in fase G2/M. Queste cellule, dunque, attraversano normalmente e velocemente le diverse fasi del ciclo. L'induzione di H-RASG12V, invece, sembra avere come effetto, già a partire dalle 24 ore di trattamento, un blocco del ciclo cellulare in fase G2/M come è possibile notare dall'aumento del picco di fluorescenza corrispondente (Fig. 4.6) e dall'aumento della percentuale di cellule in esso presenti (Fig. 4.7). Inoltre, 48 ore dopo l'induzione si osserva la comparsa di un picco pre-G0/G1 che potrebbe indicare la presenza di cellule in fase apoptotica o di necrosi che, a causa della frammentazione del DNA, incorporano meno Propidio Ioduro con conseguente riduzione della fluorescenza emessa. Infine, a 48 ore dall'induzione, e ancora di più a 72 ore, si riscontra un aumento delle cellule in fase S. Il blocco nel ciclo cellulare indotto dall'induzione dell'espressione di H-RASG12V spiega l'arresto del ritmo di crescita osservato mediante i saggi di proliferazione. La comparsa di un picco pre-G0/G1, invece, potrebbe spiegare il cambiamento morfologico descritto in precedenza. Tuttavia le analisi FACS eseguite con la sola marcatura mediante Propidio Ioduro non sono sufficienti per caratterizzare il tipo di morte cellulare.

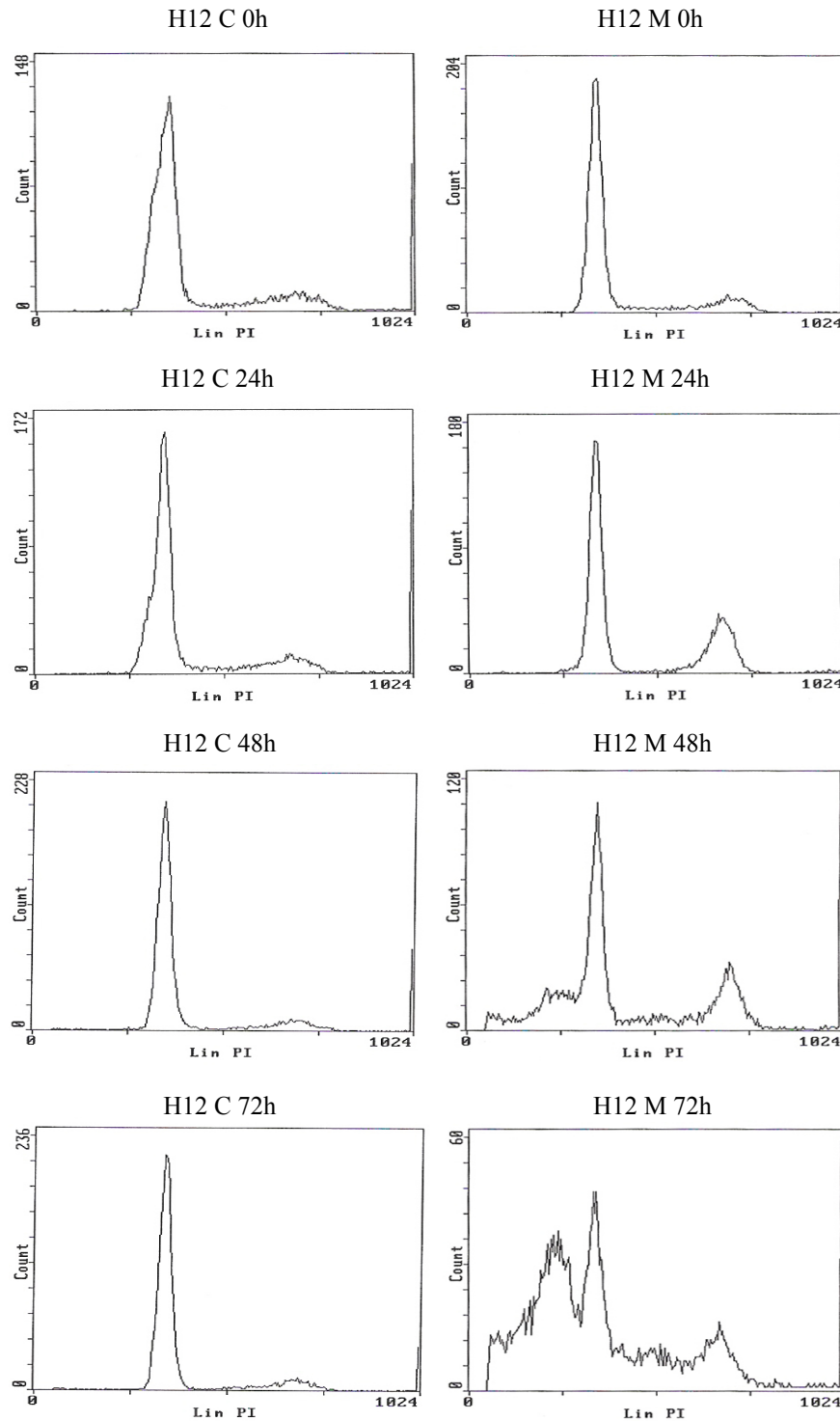


Figura 4.6. Analisi FACS eseguita sui campioni H12 C e H12 M a diverse ore di trattamento con Mifepristone. I grafici sono stati generati ponendo in ordinata il numero di cellule analizzate e in ascissa l'intensità di fluorescenza derivante dalla quantità di Propidio Ioduro incorporato.

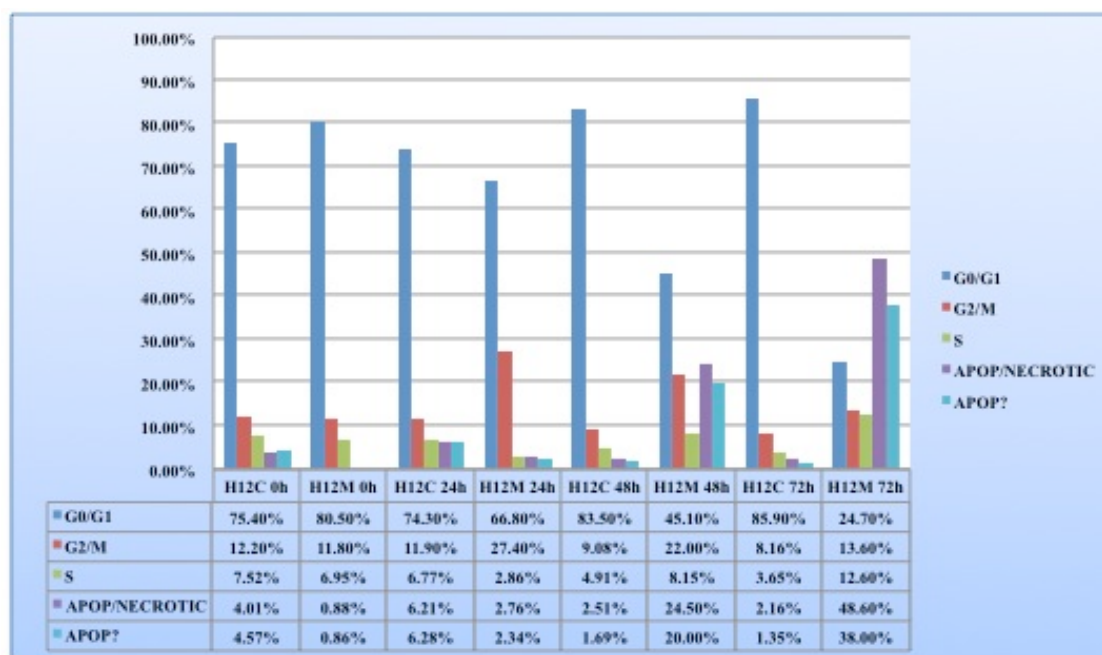


Figura 4.7. Valori percentuali ottenuti mediante FACS della quantità' di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare. I valori sono stati riportati in grafico mediante il programma Excel.

Per comprendere se l'effetto determinato dall'induzione di HRASG12V fosse realmente un evento apoptotico e' stato necessario eseguire un'ulteriore analisi citofluorimetrica utilizzando contemporaneamente come marcatori il Propidio Ioduro e l' Annessina V coniugata con fluoresceina isotiocianata (FITC). L'annessina V si lega alla fosfatidilserina che normalmente è confinata all'interno della membrana citoplasmatica delle cellule non apoptotiche; la comparsa della fosfatidilserina all'esterno della membrana è un indice precoce di apoptosi. La doppia marcatura Annessina V e Propidio Ioduro e la successiva analisi citofluorimetrica permettono di discriminare cellule in fase di apoptosi precoce (che legano Annessina V ma non incorporano Propidio Ioduro) o tardiva (che legano Annessina V e incorporano poco Propidio Ioduro) da quelle necrotiche (che incorporano solo Propidio Ioduro).

Le analisi citofluorimetriche sono state eseguite a diversi tempi di trattamento con Mifepristone. Per ciascun campione, le cellule sono state raccolte e risospese nel binding buffer fornito dal kit (v. Materiali e Metodi). Dopo aggiunta di Annessina V coniugata con FITC e Propidio Ioduro i campioni sono stati incubati per cinque minuti al buio a temperatura ambiente e subito analizzati.

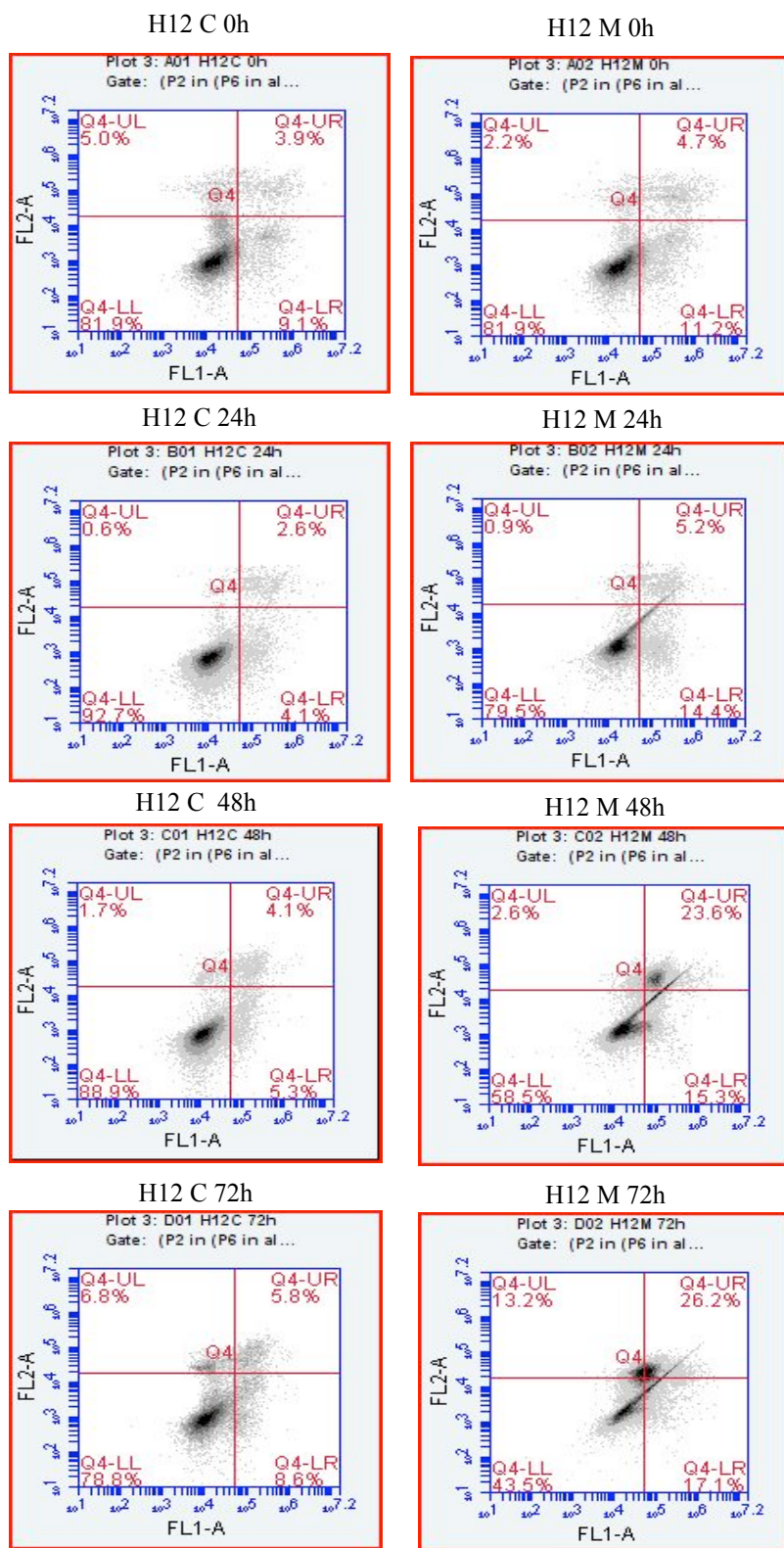


Figura 4.8. Analisi FACS eseguita sui campioni H12 C e H12 M a diverse ore di trattamento con Mifepristone. I grafici sono stati generati ponendo in ordinata l'intensità di fluorescenza derivante dalla quantità di Propidio Ioduro incorporato e in ascissa l'intensità di fluorescenza derivante dalla quantità di Annessina V coniugata con FITC legata alla fosfatidilserina.

I risultati ottenuti sono mostrati in figura 4.8 dove sono mostrati i valori di fluorescenza dell'Annessina V in funzione della quantità di Propidio Ioduro incorporato dalle cellule e in figura 4.9 nella quale e' riportato un grafico dei valori in percentuale delle cellule vive (Q4-LL); in apoptosi precoce (Q4-LR); in apoptosi tardiva (Q4-UR); necrotiche (Q4-UL).

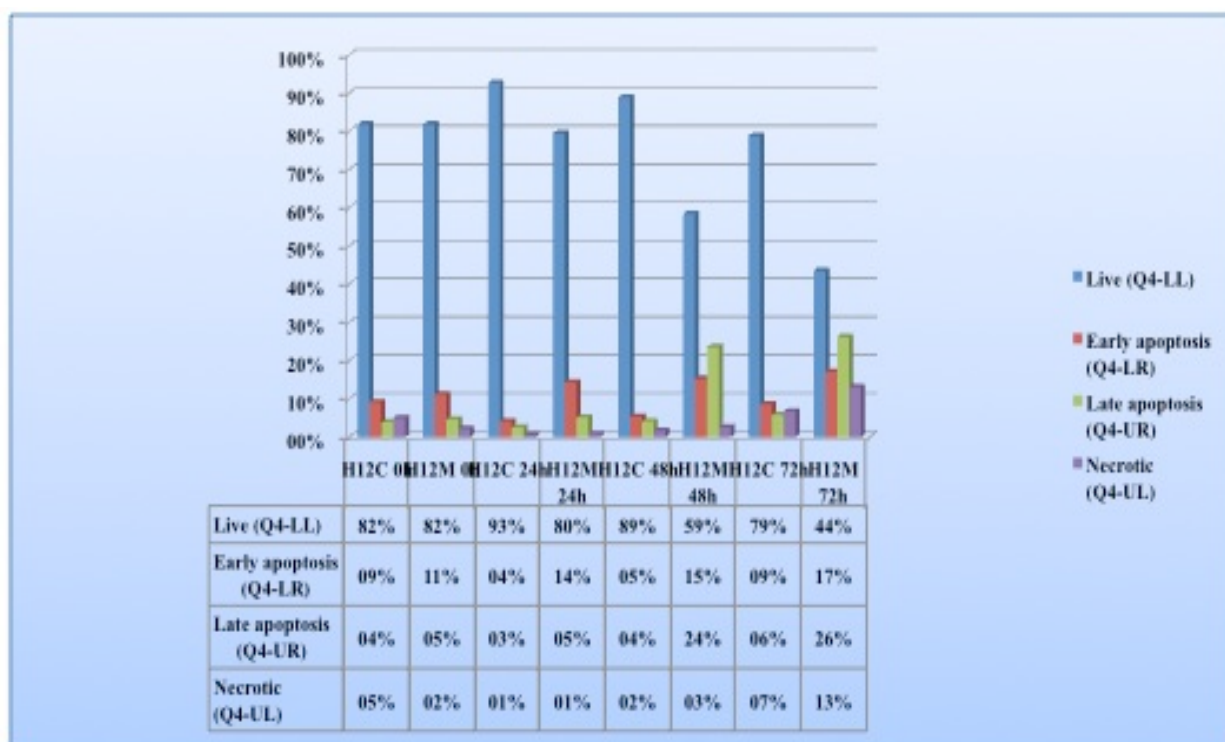
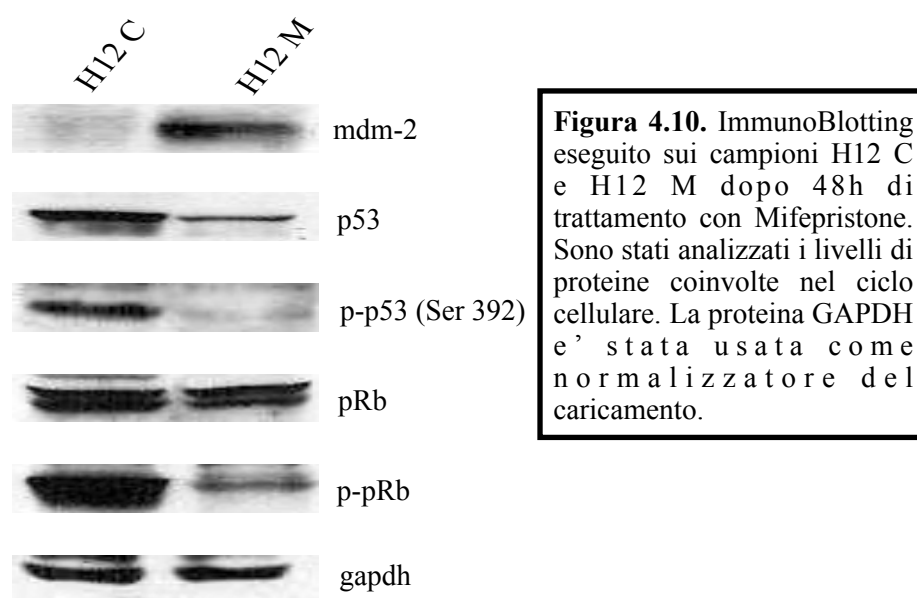


Figura 4.9. Valori percentuali ottenuti mediante FACS della quantità' di cellule vive (Q4-LL); in apoptosi precoce (Q4-LR); in apoptosi tardiva (Q4-UR); necrotiche (Q4-UL) presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare. I valori sono stati riportati in grafico mediante il programma Excel.

Dall'analisi delle figure 4.8 e 4.9 risulta evidente che dopo 24 ore di trattamento aumenta la percentuale di cellule in fase di apoptosi precoce e dopo 48 ore aumenta la percentuale di quelle in fase tardiva. La percentuale di cellule necrotiche si mantiene costante tra controllo e trattato fino alle 72 ore quando aumenta sensibilmente.

L'induzione dell'espressione di HRASG12V determina, dunque, in cellule HT-29, un arresto del ciclo cellulare con blocco in fase G2/M (osservato dopo 24 ore di trattamento) e successivamente l'insorgenza di un fenomeno apoptotico (osservato a partire dalle 24 ore).

Le cellule HT-29 presentano un background genetico in cui il gene p16 risulta alterato e la proteina non espressa (dato non mostrato) e in cui il gene p53 presenta un allele deleto e uno mutato (Gayet et al., 2001). Per comprendere, dunque, quali altri fattori possano essere implicati nel blocco del ciclo cellulare mediato da HRasG12V sono stati eseguiti saggi di western immunoblotting per valutare i livelli di espressione di alcune proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare.



Uguali quantità di lisato proteico sono state caricate su gel in seguito a denaturazione per bollitura e quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Whatman). Le membrane sono state incubate con i rispettivi anticorpi e quindi sviluppate e analizzate (v. Materiali e Metodi). In figura 4.10 sono mostrati gli immunoblotting realizzati con anticorpi in grado di riconoscere diversi fattori coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. Il pathway di regolazione a monte di p53 sembra perfettamente funzionale nelle HT-29, come si potrebbe prevedere in seguito ad attivazione di un oncogene quale Ras, infatti, si nota un aumento della proteina MDM-2 che regola negativamente i livelli di p53 determinando la sua ubiquitinazione e conseguente degradazione. Si nota, inoltre, una diminuzione del livello di p53 e della sua forma fosforilata (la fosforilazione di p53 ne aumenta la stabilità); p53 non sembra dunque responsabile della

regolazione negativa del ciclo cellulare e del blocco in G2/M determinato dall'induzione di HRASG12V.

Tuttavia, in accordo con i risultati delle analisi FACS che rivelano un blocco del ciclo cellulare, i livelli della proteina RB nella sua forma iper-fosforilata (inattiva) diminuiscono notevolmente rispetto al controllo (Fig.4.10) in seguito al trattamento con Mifepristone. Pertanto, potrebbe essere presente un meccanismo di regolazione negativa del ciclo cellulare p53-indipendente, mediato da Ras attraverso altre proteine regolatrici. Sono stati quindi analizzati i livelli proteici dei fattori p27 e p21 (Fig. 4.11a), entrambi implicati nella regolazione del ciclo cellulare e nell'induzione di apoptosi.

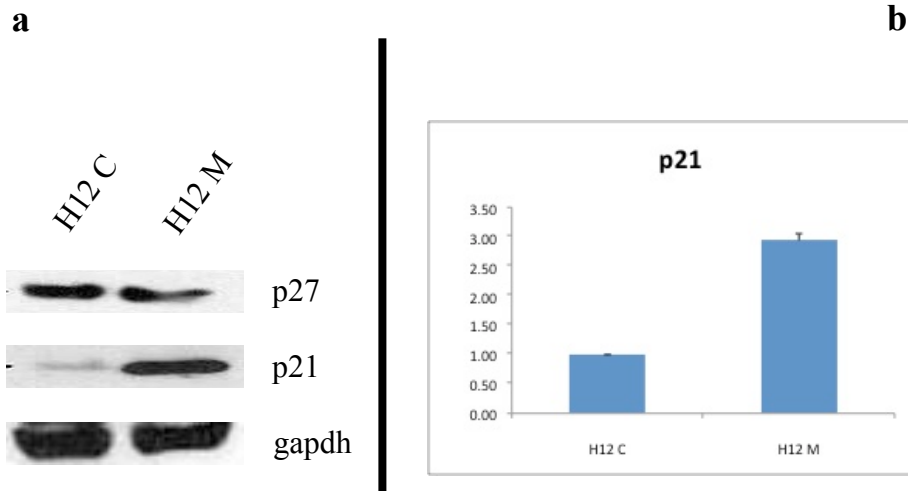


Figura 4.11a. ImmunoBlotting eseguito sui campioni H12 C e H12 M dopo 48h di trattamento con Mifepristone. Sono stati analizzati i livelli di due regolatori del ciclo cellulare. La proteina GAPDH e' stata usata come normalizzatore del caricamento. **Figura 4.11b.** Real-Time PCR eseguita sui campioni H12 C e H12 M. Sono stati analizzati i livelli di mRNA di p21. La deviazione standard e' stata calcolata sulla base di tre esperimenti indipendenti.

I livelli di espressione della proteina p27 non sembrano subire alcuna variazione in seguito all'induzione di HRASG12V. Al contrario, e' possibile notare un notevole incremento dei livelli della proteina p21 (Fig.4.11a) e del suo mRNA (Fig.4.11b). Tale dato e' confermato da saggi di immunofluorescenza (Fig. 4.12) in cui l' incremento dei livelli di p21 gia' a partire dalle 24 ore di trattamento con mifepristone si evince dall' aumento della fluorescenza verde determinata dall' anticorpo anti-p21.

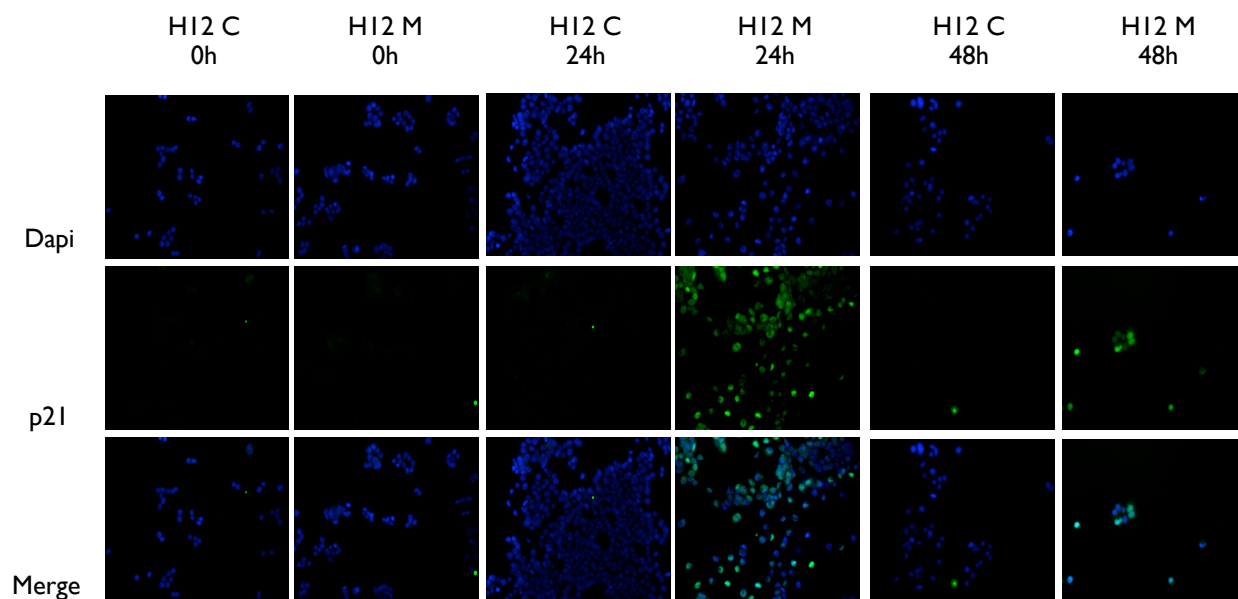


Figura 4.12 Saggi di immunofluorescenza eseguiti su cellule H12 C e H12 M a diversi tempi di trattamento con Mifepristone. Lo staining e' stato eseguito utilizzando la colorazione DAPI (in blu) e un anticorpo anti-p21 (in verde). Il merge e' stato effettuato sovrapponendo le immagini acquisite fotografando lo stesso campo ma utilizzando filtri differenti.

Studi di epigenetica dimostrano che l'attivazione trascrizionale di molti fattori e' associata ad un aumento della acetilazione dei loro promotori e che uno dei marker principali di attivazione e' la tri-metilazione sulla lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3). Poiche' il livello di mRNA di p21 risulta incrementato in seguito ad induzione da parte di HRASG12V ho eseguito uno studio del suo promotore mediante saggi di immunoprecipitazione della cromatina (Fig. 4.13). Le cellule H12 trattate con Mifepristone e non trattate sono state fissate con formaldeide e, in seguito a lisi ed estrazione dei nuclei, la cromatina e' stata digerita e i frammenti ottenuti, dalle dimensioni medie comprese tra le 200bp e le 500bp, sono stati immunoprecipitati con anticorpi in grado di riconoscere la forma acetilata dell' istone H3 e la forma trimetilata delle lisine 4 e 27 dell' istone

H3 e con i rispettivi anti-siero utilizzati come controllo negativo. Una volta purificato, il DNA immunoprecipitato e' stato amplificato mediante PCR utilizzando quattro differenti coppie di primers disegnate sulla regione prossimale del promotore di p21. L'analisi delle bande ottenute in seguito alla corsa elettroforetica dei prodotti di PCR mostra che in seguito all'espressione di HRASG12V il promotore prossimale di p21 sembra subire un incremento dell' acetilazione sull'istone H3 (Fig.4.13a) e un incremento della tri-metilazione sulla lisina 4 dell'istone H3 (Fig. 4.13b). Tuttavia non e' possibile escludere che l'aumento dei livelli di mRNA sia dovuto ad una stabilizzazione del messaggero stesso piuttosto che da una attivazione trascrizionale. Pertanto, al fine di comprendere meglio questo meccanismo, saranno necessarie ulteriori analisi quali Q-RT-PCR ChIP e studi sulla stabilita' del trascritto.

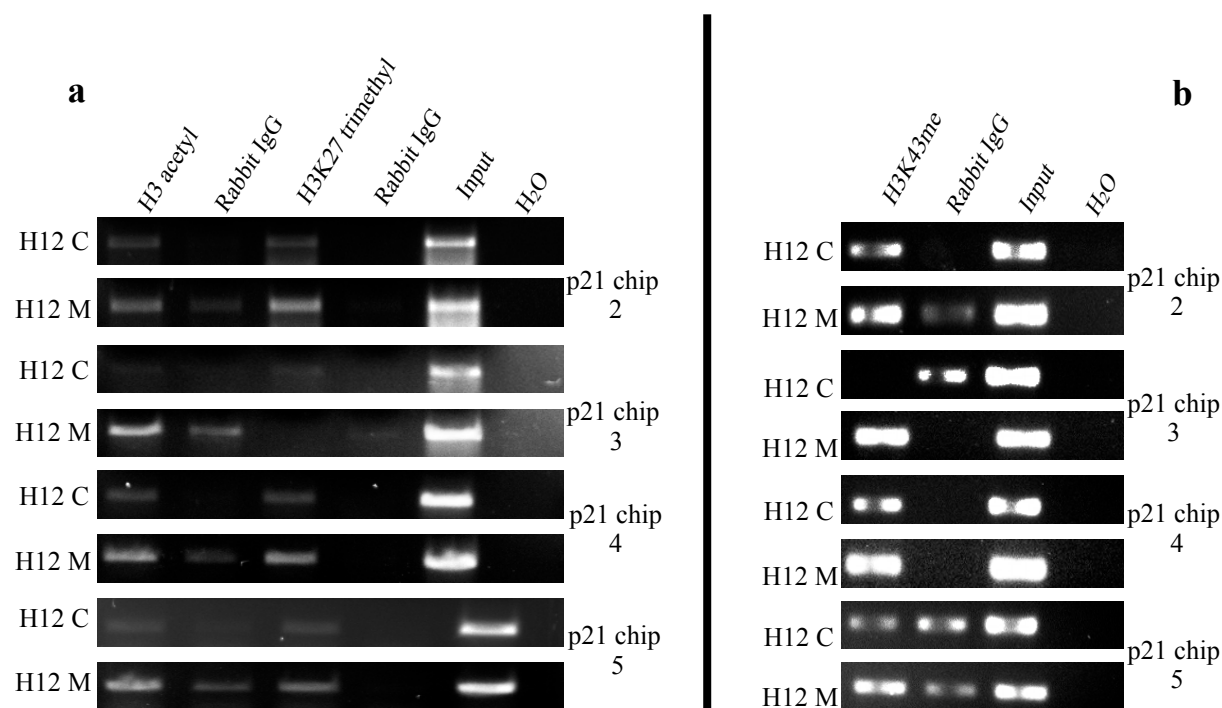


Figura 4.13 Saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) eseguiti sui campioni H12C e H12M. La cromatina e' stata frammentata mediante digestione enzimatica per 10 minuti. La cromatina non immunoprecipitata e purificata e' stata diluita 1:100 e utilizzata come Input. L'immunoprecipitazione e' stata eseguita utilizzando gli anticorpi indicati. **a.** 5µl e 10 µl di siero di coniglio sono stati utilizzati rispettivamente per H3 acetyl e H3K27 come controllo negativo. **b.** 5µl di siero di coniglio sono stati utilizzati H3K43me come controllo negativo.

La proteina Ras e' in grado di determinare effetti differenti all'interno di una cellula utilizzando due principali cascate di segnalazione, una mediata dalla proteina RAF, che attiva a sua volta una cascata di MAP-chinasi, e una mediata dalla fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K). Al fine di valutare se gli effetti osservati nelle HT-29, in seguito ad induzione di HRASG12V, fossero dovuti all'attivazione di uno dei due pathway o di entrambi, le cellule H12 C e H12 M sono state trattate con specifici inibitori di proteine implicate in queste cascate di segnalazione. In particolare sono stati utilizzati la Wortmannina, inibitore specifico della PI3K, e il PD98059, inibitore specifico della proteina MEK-1, una chinasi che agisce a valle della proteina Raf. L'efficacia di entrambi gli inibitori e' stata verificata mediante analisi di western immunoblotting sui livelli di fosforilazione di proteine a valle della PI3K e di MEK-1 (dato non mostrato). Successivamente sono state eseguite osservazioni morfologiche sui campioni H12 C e H12 M (Fig.4.13 a), saggi di vitalità XTT (Fig.4.13 b) e analisi di western immunoblotting per verificare eventuali cambiamenti nei livelli di espressione di p21 e della proteina pro-apoptotica BAX (Fig. 4.14).

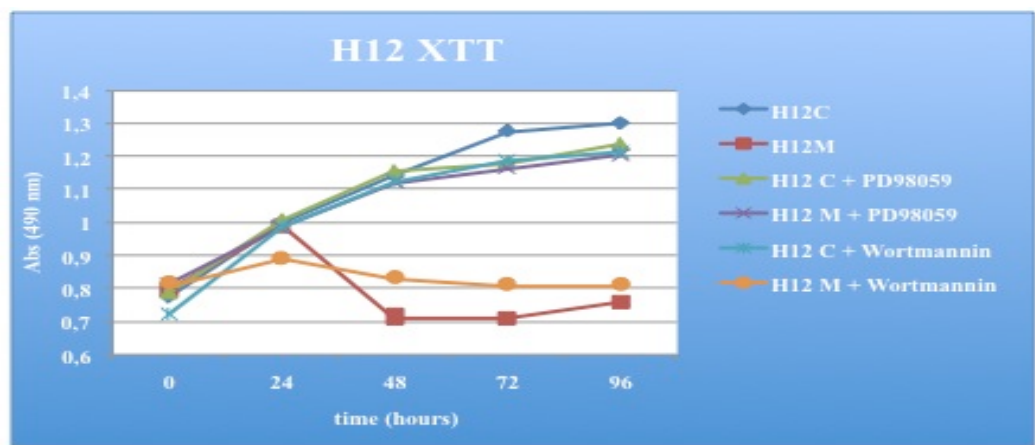
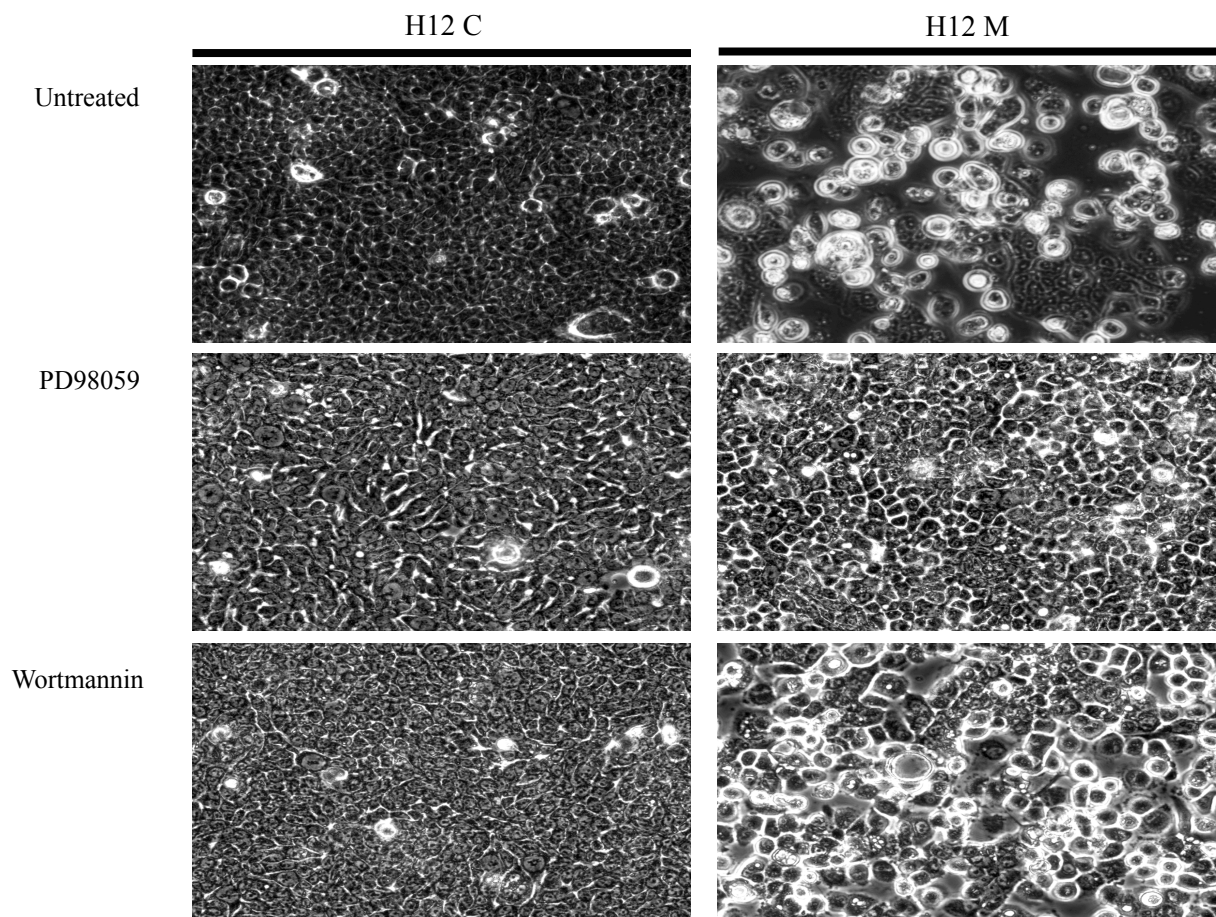


Figura 4.13. a. A sinistra cellule H12 C non trattate con inibitori, trattate con PD98059 ($20\mu\text{M}$), trattate con Wortmannina ($1\mu\text{M}$) per 48 ore. A destra cellule H12 M non trattate con inibitori, trattate con PD98059 ($20\mu\text{M}$), trattate con Wortmannina ($1\mu\text{M}$) per 48 ore. Le cellule sono state visualizzate mediante microscopio ottico con ingrandimento 20X e quindi fotografate. **b.** Saggi di vitalità XTT eseguiti sui campioni H12 C e H12 M trattati con Wortmannina o con PD98059. La deviazione standard e' calcolata sulla base di tre esperimenti indipendenti.

Solo il trattamento con l'inibitore PD98059 sembra abolire quasi completamente o, comunque, rallentare la comparsa del fenotipo osservato nelle cellule H12 trattate con Mifepristone e contemporaneamente eliminare anche l'effetto dell'induzione di HRASG12V sul ritmo di proliferazione cellulare.

Dal punto di vista molecolare si osserva che l'attivazione di p21, in seguito ad induzione di HRASG12V, risulta notevolmente ridotta in seguito all'inibizione della MEK-1 da parte del PD98059 ma non quando e' inibita la PI3K. Al contrario, i livelli della proteina pro-apoptotica BAX sembrano subire un lieve decremento nelle prime 24 ore che risulta piu' pronunciato a tempi successivi in tutti i campioni indotti anche se trattati con gli inibitori. Tuttavia e' da notare che in presenza di PD98059 tale decremento sembra essere piu' modesto.

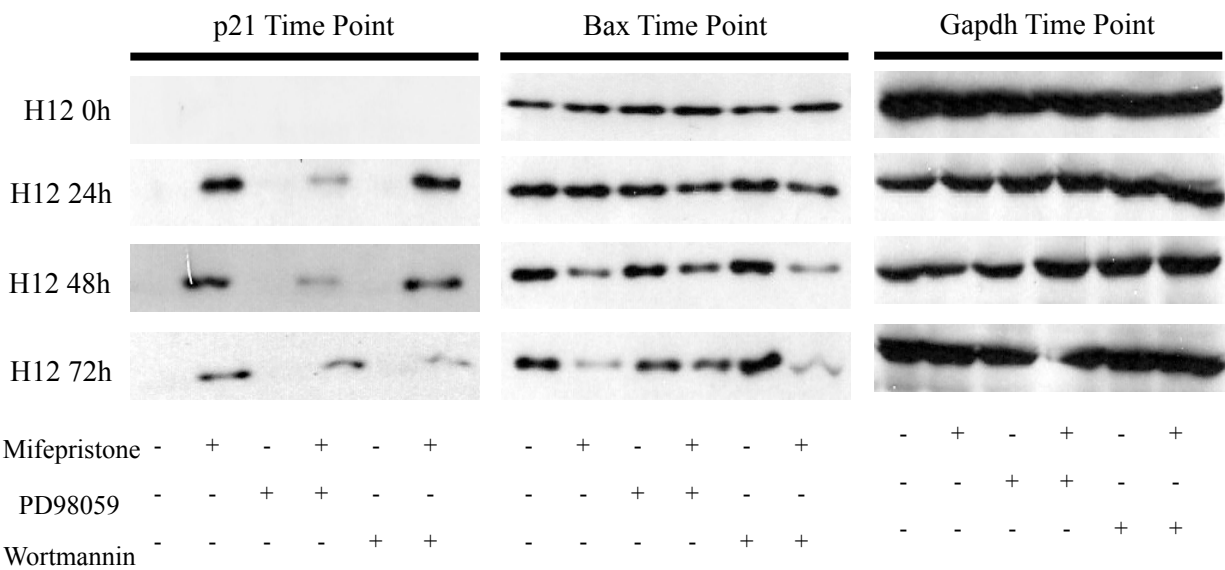


Figura 13. ImmunoBlotting eseguito su estratti proteici di cellule H12 a diversi tempi di trattamento con Mifepristone, PD98059 , Wortmannina. Sono stati analizzati i livelli di p21 e BAX. La proteina GAPDH e' stata usata come normalizzatore del caricamento.

Da quanto fin qui descritto sembra che l'induzione di HRASG12V possa indurre nelle HT-29 un arresto del ciclo cellulare e conseguente apoptosi mediati da p21 in maniera p53 indipendente. L'apoptosi può essere determinata sia da un pathway intrinseco, che prevede l'attivazione

trascrizionale o il rilascio da parte dei mitocondri di proteine pro-apoptotiche e l'attivazione della caspasi-9, sia da un pathway estrinseco che prevede l'attivazione delle caspasi -3, -7, -8.

L'apoptosi determinata da HRASG12V nelle HT-29, come mostrato sia in figura 4.14 che in figura 4.15a non sembra attivare proteine anti-apoptotiche come BCL-2 ma, allo stesso tempo, non sembra determinare alcun aumento dei livelli di proteine pro-apoptotiche, anzi, nel caso della proteina BAX sembra reprimerne l'azione.

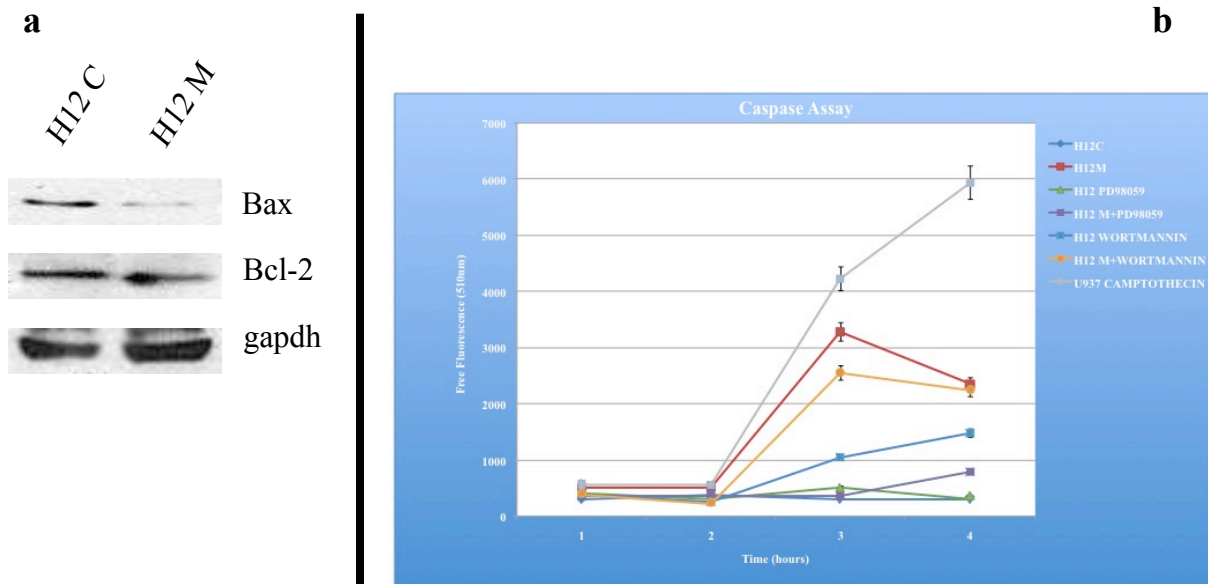


Figura 4.15 a. Immunoblotting eseguito su estratti proteici di cellule H12 C e H12M. Sono stati analizzati i livelli di Bax e Bcl-2. La proteina GAPDH e' stata usata come normalizzatore del caricamento. **b.** Saggio di attività caspasi eseguiti sui campioni H12 C e H12 M trattati con Wortmannina o con PD98059. Sull'asse delle ordinate e' indicata l'intensità di fluorescenza emessa dalla rodamina-110 rilasciata in seguito al taglio caspasico. In ascissa sono indicati i tempi di trattamento corrispondenti a 0, 24, 48, 72 ore. Le cellule U937 trattate con camptotecina sono utilizzate come controllo positivo. La deviazione standard e' calcolata sulla base di tre esperimenti indipendenti.

Nelle H12 trattate con Mifepristone, piuttosto, sembra essere attivato il pathway estrinseco. Il grafico in figura 4.15b rappresenta il risultato di un saggio di determinazione dell'attività delle caspasi implicate in tale pathway, eseguito utilizzando il kit "Homogenous Caspases Assay (Roche)" (v. Materiali e Metodi) su cellule H12 C e H12 M trattate con gli inibitori wortmannina e PD98059 e non trattate. L'induzione dell'espressione dell'isoforma mutata di Ras e' in grado di determinare un notevole aumento dell'attività caspasi anche in presenza dell'inibitore del

pathway della PI3K. L'inibitore del pathway delle MAP-Chinasi, al contrario e in maniera coerente con quanto mostrato in precedenza, annulla l'effetto di HRASG12V.

5. CONCLUSIONI

Gli esperimenti descritti in questa relazione mostrano che l'espressione di differenti isoforme mutate della proteina Ras, in particolare, HRasG12V; KRasG13D e KRasG12V, determina effetti profondamente diversi sul comportamento della linea cellulare di carcinoma coloretale HT29 e confermano dati, presenti in letteratura, ottenuti mediante esperimenti *in vivo*. Tali effetti riguardano cambiamenti nella morfologia e nel ritmo proliferativo delle HT29 e, in particolare, l'isoforma HRasG12V sembra essere quella in grado di determinare i maggiori sconvolgimenti sia da un punto di vista fenotipico che molecolare. Nel nostro sistema sperimentale, infatti, l'espressione di tale isoforma mutata determina un rapido arresto del ritmo proliferativo e una serie di cambiamenti morfologici che riguardano i contatti cellula-cellula e cellula-substrato. Le analisi FACS eseguite con Propidio Ioduro e con Annessina V hanno mostrato, le prime, un arresto nel ciclo cellulare già dopo 24 ore di espressione di HRasG12V e le seconde, la presenza di un chiaro fenomeno apoptotico. Non siamo attualmente in grado di definire con certezza se l'arresto nel ciclo cellulare avviene durante la fase replicativa (S), durante la fase pre-mitotica G2/M o in entrambe.

Dal punto di vista molecolare, la proteina RB, responsabile della progressione della cellula attraverso il suo normale ciclo, risulta ipofosforilata coerentemente con il fatto che le cellule risultano arrestate. Gli esperimenti di western immunoblotting e di immunofluorescenza hanno evidenziato che il fattore responsabile del blocco nel ciclo cellulare e della conseguente apoptosi non è p53, il quale sembra essere regolato negativamente, ma p21CIP/WAF1.

Gli esperimenti descritti in questa relazione hanno inoltre messo in luce un meccanismo, che a nostra conoscenza non è mai stato descritto in letteratura, in cui HRasG12V attraverso il pathway di Raf/MAPK sembra essere in grado di attivare p21CIP/WAF1 e determinare il blocco del ciclo cellulare e l'apoptosi attraverso il pathway estrinseco della cascata caspatica. Certamente saranno necessarie ulteriori analisi per comprendere meglio il meccanismo appena descritto al fine di ottenere anche applicazioni in campo clinico per la cura di alcuni tipi di carcinoma coloretale.

Inoltre, il fatto che un oncogene come HRasG12V possa in alcuni casi, in un sistema *in vitro*, determinare effetti di questo tipo su una linea cellulare tumorale pone degli interrogativi sull'opportunità di usare come agenti chemioterapici gli inibitori delle MAPK e mette in risalto la

necessita' di conoscere il background genetico di un paziente affetto da patologia tumorale al fine di predisporre una terapia adeguata.

6. BIBLIOGRAFIA

Adjei AA. “*Novel combinations based on epidermal growth factor receptor inhibition.*” Clin Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 2):4446s-4450s.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1995). “*Biologia Molecolare della Cellula*”. Zanichelli.

Bardeesy Nabeel, Norman E. Sharpless. “*RAS unplugged: Negative feedback and oncogene-induced senescence*” Cancer Cell 10, December 2006

Barbacid M. “*Ras genes*” Annual Review of Biochemistry (1987) 56:779-827.

Bazan V., Migliavacca M., Zanna I., Tubiolo C., Grassi N., Latteri A., La Farina M., Albanese I., Dardanoni G., Tomasino R. M., Labianca R., Gebbia N. & Russo A. “*Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype*”. Annals of Oncology, (2002) vol. 13(9): 1438-1446.

Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A., Miura J., Wiener HH, Wright L., Saba SG, Yim D., Fein A., Perez De Castro I., Li C., Thompson CB, Cox AD, Philips MR. “*PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis.*” Mol Cell. 2006 Feb 17;21(4): 481-93.

Bos J. L. “*Ras oncogenes in human cancer*”. Cancer Research (1989) vol.49: 4682-4689.

Bringold F., Serrano M. “*Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence.*” Exp Gerontol. 2000 May;35(3):317-29.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. “*Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer*”. *Nature*. 1994 Mar 17;368 (6468):258-61.

Buchkovich K., Duffy LA, Harlow E. “*The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle.*” *Cell* 1989 Sep 22;58(6):1097-105.

Burkert J, Wright NA, and Alison MR. “*Stem cells and cancer: an intimate relationship*”. *J Pathol* 2006; 209: 287–297

Cagnol S., Chambard JC. “*ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence.*” *FEBS J*. 2010 Jan;277(1):2-21.

Choy E., Chiu VK, Silletti J., Feoktistov M., Morimoto T., Michaelson D., Ivanov IE, Philips MR. “*Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi.*” *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):69-80

Courtois-Cox Stephanie, Sybil M. Genter Williams, Elizabeth E. Reczek, Bryan W. Johnson, Lauren T. McGillicuddy, Cory M. Johannessen, Pablo E. Hollstein, MiaMacCollin, and Karen Cichowski. “*A negative feedback signaling network underlies oncogeneinduced senescence*”. *Cancer Cell* 10, 459–472, December 2006

Datta S., Hoenerhoff MJ, Bommi P., Sainger R., Guo WJ, Dimri M., Band H., Band V., Green JE, Dimri GP. “*Bmi-1 cooperates with H-Ras to transform human mammary epithelial cells via dysregulation of multiple growth-regulatory pathways.*” *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67 (21):10286-95.

Denoyelle C., Abou-Rjaily G., Bezrookove V., Verhaegen M., Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, Kaufman RJ, Bastian BC, Soengas MS.

“Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway.” Nat Cell Biol. 2006 Oct;8(10):1053-63.

Ellington AA, Berhow MA, Singletary KW. *“Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells.” Carcinogenesis. 2006 Feb;27(2):298-306.*

Fearon E. e Vogelstein B. (1990) *“A genetic model for colorectal tumorigenesis” Cell vol. 61: 759-767.*

Gayet J., Zhou X.P., Duval A., Rolland S., Hoang J.M., Cottu P., Hamelin R. *“Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines.” Oncogene (2001) 20: 5025-5032.*

Guil S., de La Iglesia N., Fernandez-Larrea J., Cifuentes D., Ferrer JC, Guinovart JJ., Bach-Elias M. *“Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus.” Cancer Res. 2003 Sep 1;63(17):5178-87.*

Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC. *“NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway.” Neuron. 2001 Dec 6;32(5):801-14.*

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. *“Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis”. Nature. 1993 Jun 10;363(6429):558-61.*

Kang Y., Siegel P.M., Shu W., Drobnjak M., Kakonen S.M., Cordon-Cardo C., Guise T.A., Massaguè J. “*A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*”. *Cancer Cell* (2003) 3: 537-549.

Lewin B. “*il gene VI*” Zanichelli (1999).

Li DW, Liu JP, Mao YW, Xiang H., Wang J., Ma WY, Dong Z., Pike HM, Brown RE, Reed JC. “*Calcium-activated RAF/MEK/ERK signaling pathway mediates p53-dependent apoptosis and is abrogated by alpha B-crystallin through inhibition of RAS activation.*” *Mol Biol Cell*. 2005 Sep;16(9):4437-53.

Li Ruhong, Arvind Sonik, Reinhard Stindl, David Rasnick, and Peter Duesberg, “*Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: Recent study claims mutation but is found to support aneuploidy*”. 3236–3241 PNAS March 28, 2000 vol. 97 no. 7

Lind GE., Thorstensen L., Lovig T., Meling GL., Hamelin R., Rognum TO., Esteller M and Lothe RA. “*A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell line*” *Molecular Cancer* (2004) 3:28-38.

Lowy DR., Willumsen BM. “*Function and regulation of ras*” *Annual Review of Biochemistry* (1993) 62:851-891

Maiuri MC, Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. “*Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.*” *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):741-52.

Markowitz S.D., Dawson D.M., Willis J., Willson J.K.V. *“Focus on colon cancer”*. Cancer Cell (2002), vol.1, 233-236.

Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, Takeichi M, Niitsu Y. *“Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid”*. Br J Cancer. 1992 Dec;66(6):1122-30

Molina Julian R., and Alex A. Adjei. *“The Ras/Raf/MAPK Pathway”*. J Thorac Oncol. 2006; 1: 7–9.

Morgan DO. *“Principles of CDK regulation.”* Nature 1995 Mar 9;374(6518):131-4.

Narita M., Young AR, Narita M. *“Autophagy facilitates oncogene-induced senescence.”* Autophagy. 2009 Oct;5(7):1046-7.

Nestreov A., Nikrad M., Johnson T., Krafts AS. *“Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis.”* Cancer Res. 2004 Jun 1;64(11):3922-7.

Nicke B., Bastien J., Khanna S., Warne P., Bowling V., Cook S.J., Peters G., Delpuech O., Schulze A., Berns K., Mullenders J., Beijersbergen R., Bernards R., Ganesan T., Downward J., Hancock D., *“Involvement of MINK, a ste20 family Kinase, in a Ras Oncogene-Induced Growth arrest in human ovarian surface epithelial cells”* Molecular Cell (2005) 20: 673-685.

Ocker M., Schneider-Stock R. *“Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1.”* Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(7-8):1367-74.

Omerovic J., A. J. Laude and I. A. Prior. “*Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling*” Cell. Mol. Life Sci. 2007 Oct; 64(19-20):2575-89.

Papailiou J., Bramis KJ., Gazouli M., Theodoropoulos G. “*Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins.*” Int. J. Colorectal Dis 2011 Jan; 26(1):1-11.

Polyak K., Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J., Roberts JM, Koff A. “*p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.*” Genes Dev. 1994 Jan;8(1):9-22.

Prior A. and Hancock JF. “*Compartmentalization of Ras proteins*” Journal of Cell Science (2001) 114: 1603-1608.

Prior IA, Muncke C., Parton RG, Hancock JF. “*Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains.*” J Cell Biolog. 2003 Jan 20;160(2):165-70

Ramaswamy S., Ross K.N., Lander E.S., Golub T.R. “*A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*”. Nature genetics (2003) 33: 49-54.

Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. “*Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype.*” Science. 1997 Feb 14;275(5302):967-9

Rocks Oliver, Anna Peyker and Philippe IH Bastiaens. “*Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors*”. Current Opinion in Cell Biology 2006, 18:351–357

Schmidt-Kittler O., Ragg T., Daskalakis A., Granzow M., Ahr A., Blankestien T., Kaufmann M., Diebold J., Arnholdt H., Muller P., Bischoff J., Harich D., Schlimok G.,

Riethmuller G., Eils R., Klein C.A. *“From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression”*. PNAS (2003) vol 100 n°13: 7737-7742.

Sewing A., Wiseman B., Lloyd AC, Land H. *“High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1.”* Mol Cell Biol. 1997 Sep;17(9):5588-97.

Takayama T., Miyanishi K., Sato Y., Niitsu Y. *“Colorectal cancer: genetics of development and metastasis”* J. Gastroenterol. (2006) 41: 185-192.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. *“Microsatellite instability in cancer of the proximal colon”*. Science. 1993 May 7;260(5109):816-9.

Vogelstein B. and Kinzler K. *“The multistep nature of cancer”* TIG (1993) vol.9 (4): 138-141

Wade S. Samowitz, Martha L. Slattery, Carol Sweeney, Jennifer Herrick, Roger K. Wolff, and Hans Albertsen. *“APC Mutations and Other Genetic and Epigenetic Changes in Colon Cancer”*. (Mol Cancer Res (2007);vol. 5(2):165–70)

Woods D., Parry D., Cherwinski H., Bosch E., Lees E., McMahon M. *“Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1.”* Mol Cell Biol. 1997 Sep;17(9):5598-611.

Wright LP, Philips MR. *“Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras.”* J Lipid Res. 2006 May; 47(5):883-91.

Yan J., Roy S., Apolloni A., Lane A., Hancock JF. *“Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase.”* J Biol Chem. 1998 Sep 11;273(37):24052-6.

Yang R., Piperdi S., Gorlick R. *“Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma.”* Clin Cancer Res. 2008 Oct 15;14(20):6396-404.

Young AR, Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot JF, Tavaré S, Arakawa S., Shimizu S., Watt FM, Narita M. *“Autophagy mediates the mitotic senescence transition.”* Genes Dev. 2009 Apr 1;23(7):798-803.

Zhang B., Hirahashi J., Cullere X., Mayadas TN. *“Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation.”* J Biol Chem. 2003 Aug 1;278(31):28443-54.

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 2
PREMESSA E SCOPO DELLA RICERCA	pag. 25
MATERIALI E METODI	pag. 29
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 41
CONCLUSIONI	pag. 63
BIBLIOGRAFIA	pag. 66